

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

Sustancias perfluoradas: PFSA, PFCA, FOSA, N-MeFOSA y N-EtFOSA. Desarrollo de metodologías analíticas y aplicación a muestras ambientales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Navarro Martín

Directora

María de los Ángeles Martínez Calvo

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



SUSTANCIAS PERFLUORADAS: PFSA, PFCA, FOSA, *N*-MeFOSA Y *N*-EtFOSA. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS Y APLICACIÓN A MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

IRENE NAVARRO MARTÍN

Memoria presentada para optar al Grado de Doctora
por la Universidad Complutense de Madrid

Directora del trabajo:

Dra. María de los Ángeles Martínez Calvo

Departamento de Medio Ambiente

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)



Tutora del trabajo:

Dra. María Jesús Santos Delgado

Departamento de Química Analítica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Complutense de Madrid

A mis padres.

A Rodolfo.

A Jaime y Alejandra.

MARÍA DE LOS ÁNGELES MARTÍNEZ CALVO, Científica Titular de Organismos Públicos de Investigación y Responsable del Grupo de Contaminantes Orgánicos Persistentes del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT).

CERTIFICA

Que el presente trabajo de investigación titulado: “SUSTANCIAS PERFLUORADAS: PFSA, PFCA, FOSA, *N*-MeFOSA Y *N*-EtFOSA. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS Y APLICACIÓN A MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES”, constituye la memoria que presenta Irene Navarro Martín para optar al Grado de Doctora, y que ha sido realizado bajo mi dirección en los Laboratorios del Grupo de Contaminantes Orgánicos Persistentes del CIEMAT.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid, a 10 de marzo de 2017.

Dra. María de los Ángeles Martínez Calvo

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo de investigación no hubiera sido posible sin el apoyo de un grupo de personas, que de un modo u otro han contribuido en su desarrollo y han permitido que se hiciera realidad. A todas ellas, me gustaría agradecer la ayuda que me han ofrecido y todos los conocimientos que me han transmitido durante estos años.

En primer lugar, quiero agradecer enormemente a mi directora de Tesis, la Dra. María de los Ángeles Martínez Calvo, la confianza depositada en mí y la oportunidad de poder crecer profesionalmente. Muchas gracias por toda la motivación y todo el apoyo que me has dado siempre (tanto en lo profesional como en lo personal).

A mis compañeros del Grupo de Contaminantes Orgánicos Persistentes, por todo vuestro apoyo y ayuda a lo largo de estos años. Gracias a Adrián por todo el conocimiento que transmites y por tu afán contagioso de mejora continua. Gracias a Paloma por todos tus valiosos consejos y a Esther, Bea H., Bea B. y Diana por vuestra dedicación y ayuda. Gracias también a aquellos que han pasado por el laboratorio y han aportado su granito de arena. En definitiva, gracias a todos por ser tan buenos compañeros.

Al Dr. Fernando Martín Llorente, a la Dra. Begoña Artíñano Rodríguez de Torres y a la Dra. Yolanda Benito Moreno por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Gregoria Carbonell Martín, al Dr. Carlos Fernández Torija, al Dr. Fco. Javier Pro González, Miguel Ángel Porcel Cots y todo el personal del Laboratorio de Ecotoxicología del INIA por el diseño experimental y su inestimable ayuda y colaboración en el desarrollo del proyecto CECAREA, bajo el que se encuentra enmarcada principalmente esta Tesis Doctoral.

A la Dra. María Jesús Santos Delgado y al Dr. Luis María Polo Díez por abrirme las puertas de la Universidad Complutense de Madrid y haber sido tutores de este trabajo de investigación.

A mis amigas Arancha y Fátima por estar siempre a mi lado. Muchas gracias por vuestra comprensión, ánimo y cariño.

A mi familia por todo su amor y apoyo incondicional. Gracias a Rodolfo, Pepa y a toda la familia Moreno-Maldonado al completo por acogerme como una más, y animarme y apoyarme en todo momento. Gracias a Rosi por su alegría, sus ánimos y por estar siempre pendiente de mí. Gracias a mis padres, Ernesto y Emilia, por su amor, por creer en mí, ayudarme y apoyarme en todas las circunstancias de la vida.

Gracias a Rodol, por confiar siempre en mí y compartir conmigo la aventura de la vida, a Jaime y Alejandra por vuestra alegría y todo el amor que desprendéis. Gracias por ser la razón de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	7
RESUMEN	13
SUMMARY	19
PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS.....	23
1. INTRODUCCIÓN.....	29
1.1. Características de las sustancias perfluoradas	29
1.2. Aplicación y producción de las sustancias perfluoradas	32
1.3. Distribución ambiental de sustancias perfluoradas.....	39
1.4. Problemática ambiental de las sustancias perfluoradas relativa a biosólidos de EDAR	42
1.5. Legislación relativa a las sustancias perfluoradas estudiadas y su posible repercusión en el medio ambiente	45
2. METODOLOGÍA ANALÍTICA	51
2.1. Introducción	51
2.2. Preparación y tratamiento de la muestra.....	52
2.2.1. Pre-tratamiento	52
2.2.2. Extracción.....	53
2.2.2.1. Extracción en fase sólida.....	53
2.2.2.2. Extracción mediante combinación de agitación, ultrasonificación y centrifugación	55
2.2.3. Purificación	55
2.3. Análisis instrumental	56
2.3.1. Cromatografía de líquidos de alta presión.....	56
2.3.2. Espectrometría de masas	58
2.3.3. Cuantificación de las sustancias perfluoradas	60
2.4. Aseguramiento de la calidad.....	64
2.5. Evaluación estadística de los datos	67

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
3.1. Optimización y validación de la metodología para el análisis de sustancias perfluoradas en muestras medioambientales	71
3.2. Transferencia de sustancias perfluoradas desde suelo enmendado a aguas de lixiviación y escorrentía.....	82
3.3. Transferencia de sustancias perfluoradas desde suelo enmendado a organismos invertebrados del suelo	94
3.4. Transferencia de sustancias perfluoradas desde suelo enmendado a plantas superiores	104
3.5. Evaluación del riesgo asociado a la aplicación agrícola de biosólidos en relación a PFOS y PFOA.....	115
3.5.1. Estimación de la exposición ambiental	115
3.5.2. Valoración de los efectos	119
3.5.3. Valoración del riesgo	120
4. CONCLUSIONES	125
5. BIBLIOGRAFÍA	131
ANEXO I.....	157
ANEXO II	163
ANEXO III.....	179
ANEXO IV	217
ANEXO V.....	239
ANEXO VI.....	271
ANEXO VII	277

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura de algunas sustancias perfluoradas: PFOS, PFOA, FOSA y 8:2 FTOH.....	29
Figura 1.2. Distribución de las sustancias perfluoradas en función de su tipo de aplicación en Reino Unido.....	33
Figura 1.3. Distribución de las sustancias perfluoradas en función de su tipo de aplicación en la producción global histórica de la compañía 3M.....	33
Figura 1.4. Esquema de la síntesis de PFOS y sustancias relacionadas mediante fluoración electroquímica	35
Figura 1.5. Esquema de la síntesis de PFOA y sustancias relacionadas mediante fluoración electroquímica	35
Figura 1.6. Esquema de la síntesis de PFOA, fluorotelómeros alcoholes y sustancias relacioandas mediante telomerización	37
Figura 1.7. Distribución y dinámica de las sustancias perfluoradas en el medio ambiente.....	41
Figura 2.1. Sistema de extracción en fase sólida utilizado en el análisis de PFAS	54
Figura 2.2. Sistema Varian 212 LC - 320 MS utilizado en el análisis de PFAS	57
Figura 2.3. Esquema del espectrómetro de masas Varian 320 MS utilizado en el análisis instrumental de las muestras	60
Figura 3.1. Contribución individual de PFAS en las muestras de lodos de EDAR estudiadas.....	80
Figura 3.2. Sistema utilizado en el estudio de semicampo para determinar la capacidad de lixiviación y escorrentía de PFOS.....	84
Figura 3.3. Detalle de una mesa del estudio de semicampo después de tomar las muestras de suelo.....	84
Figura 3.4. Concentración de PFOS en aguas de lixiviación	90
Figura 3.5. Sistemas de suelo multiespecie MS•3	98
Figura 3.6. Detalle de las lombrices de tierra (<i>Eisenia andrei</i>) utilizadas en el ensayo de MS•3.....	98
Figura 3.7. Relación de los factores de bioacumulación (BAF) de PFAS obtenidos en lombrices con el log K_{ow} de cada compuesto.....	102
Figura 3.8. Ensayo de transferencia de espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)	106

Figura 3.9. Ensayo de transferencia de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	106
Figura 3.10. Ensayo de transferencia de maíz (<i>Zea mays</i>) y detalle de las lombrices de tierra (<i>Eisenia andrei</i>)	107
Figura 3.11. Distribución de PFAS en las distintas partes de la planta de tomate.....	111
Figura 3.12. Distribución de PFAS en la planta de maíz	113
Figura 3.13. Evolución del riesgo para los organismos del suelo como resultado de la aplicación periódica de biosólidos al suelo, en relación a PFOS y PFOA	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Propiedades físico-químicas de la sal de potasio de PFOS y PFOA.....	31
Tabla 2.1. Relación de los compuestos evaluados con los correspondientes compuestos marcados empleados para su cuantificación y para el cálculo de su recuperación	63
Tabla 2.2. Factor Z obtenido para las PFAS analizadas en los diferentes ejercicios de intercomparación.....	66
Tabla 3.1. Parámetros evaluados para la optimización del sistema HPLC-MS/MS	72
Tabla 3.2. Lista de compuestos de interés analizados, transiciones monitorizadas, voltajes del capilar y energía de colisión	74
Tabla 3.3. Condiciones de extracción, purificación y análisis instrumental para la determinación de PFAS en lodo	77
Tabla 3.4. Concentración de PFAS en lodos de EDAR	79
Tabla 3.5. Comparación de resultados de PFOS y PFOA en lodos en diferentes estudios	81
Tabla 3.6. Condiciones de extracción, purificación y análisis instrumental para la determinación de PFAS en biosólidos, suelo y agua de lixiviación o escorrentía.....	85
Tabla 3.7. Concentración de PFAS en los cuatro biosólidos fortificados.....	86
Tabla 3.8. Concentración de PFAS en el suelo al principio y al final del ensayo de semicampo	89
Tabla 3.9. Concentración de PFAS en los cuatro biosólidos seleccionados	96
Tabla 3.10. Condiciones de extracción, purificación y análisis instrumental para la determinación de PFAS en lombriz de tierra	99
Tabla 3.11. Condiciones de extracción, purificación y análisis instrumental para la determinación de PFAS en las plantas de espinaca, tomate y maíz.....	108
Tabla 3.12. Concentración de PFAS en residuos, suelos y planta de tomate.....	110
Tabla 3.13. Exposición ambiental del suelo a PFOS como consecuencia de la aplicación de biosólidos a lo largo del tiempo.....	117
Tabla 3.14. Exposición ambiental del suelo a PFOA como consecuencia de la aplicación de biosólidos a lo largo del tiempo.....	117
Tabla 3.15. Exposición ambiental de los depredadores a PFOS	119

Tabla 3.16. Exposición ambiental de los depredadores a PFOA.....	119
Tabla 3.17. Evaluación de los efectos de PFOS y PFOA en el compartimento terrestre y en los organismos de niveles superiores de la cadena trófica.....	120
Tabla 3.18. Cocientes de caracterización de riesgo obtenidos para PFOS y PFOA para cada uno de los cuatro biosólidos estudiados	121

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

BAF	Factor de bioacumulación (por sus siglas en inglés, <i>Bioaccumulation Factor</i>)
COP	Contaminante Orgánico Persistente
ECF	Factor de transferencia de hoja a fruto (por sus siglas en inglés, <i>Edible part Concentration Factor</i>)
EDAR	Estación de Depuración de Aguas Residuales
ESI	Ionización por <i>Electrospray</i> (por sus siglas en inglés, <i>Electrospray Ionization</i>)
FOSA	Perfluorooctano sulfonamida
FTOH	Alcoholes fluorotelómeros
FUSLE	Extracción asistida por ultrasonidos focalizados (por sus siglas en inglés, <i>Focused Ultrasound Solid-Liquid Extraction</i>)
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (por sus siglas en inglés, <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
K_d	Coefficiente de distribución de adsorción sólido-líquido
K_{oc}	Coefficiente de distribución o partición carbono orgánico-agua
K_{ow}	Coefficiente de distribución o partición octanol-agua
LCF	Factor de transferencia de raíz a hoja (por sus siglas en inglés, <i>Leaf Concentration Factor</i>)
LOD	Límite de Detección (por sus siglas en inglés, <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Límite de Cuantificación (por sus siglas en inglés, <i>Limit of Quantification</i>)
MRM	Monitorización de Reacciones Múltiples (por sus siglas en inglés, <i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
MS	Espectrometría de masas (por sus siglas en inglés, <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometría de Masas en tándem o masas/masas
m.s.	Masa Seca
m/z	Relación masa/carga
N-EtFOSA	N-etil-perfluorooctano sulfonamida
N-MeFOSA	N-metil-perfluorooctano sulfonamida

N.D.	No Detectado
PE	Polietileno
PEC	Concentración ambiental prevista (por sus siglas en inglés, <i>Predicted Environmental Concentration</i>)
PEEK	Polieteretercetona
PFAS	Sustancias perfluoradas (por sus siglas en inglés, <i>Perfluorinated Alkyl Substances</i>)
PFBA	Ácido perfluorobutanoico
PFBS	Perfluorobutano sulfonato
PFCA	Perfluoroalquil carboxilatos o ácidos perfluorocarboxílicos
PFDA	Ácido perfluorodecanoico
PFDoA	Ácido perfluorododecanoico
PFDS	Perfluorodecano sulfonato
PFHpA	Ácido perfluoroheptanoico
PFHxA	Ácido perfluorohexanoico
PFHxDA	Ácido perfluorohexadecanoico
PFHxS	Perfluorohexano sulfonato
PFNA	Ácido perfluorononanoico
PFOA	Ácido perfluorooctanoico
PFODA	Ácido perfluorooctadecanoico
PFOS	Perfluorooctano sulfonato
PFOSF	Fluoruro de perfluorooctano sulfonilo
PFP	Pentafluorofenil
PFPeA	Ácido perfluoropentanoico
PFSA	Perfluoroalquil sulfonatos
PFTeDA	Ácido perfluorotetradecanoico
PFTTrDA	Ácido perfluorotridecanoico
PFUdA	Ácido perfluoroundecanoico
PLE	Extracción mediante líquidos presurizados (por sus siglas en inglés, <i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
PNEC	Concentración prevista sin efecto (por sus siglas en inglés, <i>Predicted No-Effect Concentration</i>)
PP	Polipropileno
PTFE	Politetrafluoroetileno o teflón

PVC	Policloruro de vinilo
RCR	Cociente de caracterización de riesgo (por sus siglas en inglés, <i>Risk Characterization Ratio</i>)
REACH	Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas (por sus siglas en inglés, <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>)
RSD	Desviación estándar relativa (por sus siglas en inglés, <i>Relative Standard Deviation</i>)
RSU	Residuo Sólido Urbano
SD	Desviación estándar (por sus siglas en inglés, <i>Standard Deviation</i>)
S/N	Señal/ruido (por sus siglas en inglés, <i>Signal/Noise</i>)
SPE	Extracción en Fase Sólida (por sus siglas en inglés, <i>Solid Phase Extraction</i>)
TF	Factor de Transferencia (por sus siglas en inglés, <i>Transfer Factor</i>)
TFE	Tetrafluoroetileno

RESUMEN

RESUMEN

Sustancias perfluoradas: PFSA, PFCA, FOSA, N-MeFOSA y N-EtFOSA. Desarrollo de metodologías analíticas y aplicación a muestras medioambientales

Las sustancias perfluoradas (PFAS), y más concretamente los perfluoroalquil sulfonatos (PFSA), los perfluoroalquil carboxilatos (PFCA) y las perfluorooctano sulfonamidas (FOSA), engloban un grupo de contaminantes emergentes que presentan características de persistencia, se distribuyen globalmente en el medio ambiente y pueden causar efectos adversos en los organismos vivos. Estas sustancias, debido a sus inusuales propiedades hidrofóbicas, lipofóbicas y de resistencia al calor, han sido utilizadas desde los años 50 en numerosas aplicaciones industriales y comerciales.

Su liberación al medio ambiente puede suceder en cada etapa del ciclo de vida del producto fluoroquímico, tanto durante su síntesis, como durante la incorporación al producto o material que lo contiene y/o la distribución, uso y eliminación final del producto como desecho.

La limitada existencia de estudios referentes a este tipo de compuestos, junto a sus propiedades toxicológicas y bioacumulativas y su inclusión en la legislación encaminada a la restricción y/o prohibición de su comercialización y uso, justifican la necesidad de su control y seguimiento. Por ello, en este trabajo de investigación, se ha desarrollado y validado un método analítico efectivo para el estudio de PFAS a nivel traza en muestras ambientales, consistente en primer lugar en una extracción mediante combinación de agitación, ultrasonificación y centrifugación seguida de una etapa de purificación mediante la técnica de extracción en fase sólida. La determinación de las sustancias perfluoradas de interés, incluyendo perfluoroalquil sulfonatos, perfluoroalquil carboxilatos y perfluorooctano sulfonamidas se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS/MS).

Es importante señalar que una fuente potencial de emisión de las sustancias perfluoradas son las estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR). Teniendo en cuenta que la utilización de biosólidos procedentes de EDAR en la agricultura es considerada una de las opciones más sostenibles para gestionar este tipo de residuos, su aplicación como enmienda agrícola podría causar una removilización de estos compuestos recalcitrantes, transfiriéndose al suelo y constituyendo una posible entrada de las sustancias perfluoradas a la cadena trófica.

Por ese motivo, una vez optimizada la metodología analítica, se determinó el contenido de sustancias perfluoradas en veinte muestras de lodos procedentes de EDAR distribuidas por toda la geografía nacional. Posteriormente, la metodología desarrollada permitió investigar la transferencia de estos compuestos a distintos compartimentos medioambientales como resultado de la aplicación de biosólidos como enmienda agrícola en suelos.

Primeramente, se estudió la capacidad de lixiviación y escorrentía de PFAS, mediante ensayos de semicampo, a partir de suelos enmendados con biosólidos. Un elevado potencial de movilidad a través del suelo mediante aguas de lixiviación y escorrentía fue observado para el perfluorooctano sulfonato, PFOS. Los niveles de PFOS en el agua de escorrentía fueron superiores a los encontrados en el agua de lixiviación, lo que podría sugerir que los fenómenos de escorrentía constituyen una ruta preferencial de transporte para este compuesto.

A continuación, mediante sistemas de suelo multiespecie MS-3 se estudió la presencia y transferencia de estos contaminantes en el sistema suelo - invertebrados del suelo. La aplicación de biosólidos conteniendo PFAS contribuyó al incremento de sustancias perfluoradas en el suelo y a la acumulación de estos compuestos en lombrices (*Eisenia andrei*).

Posteriormente se investigó la transferencia y distribución de PFAS en plantas de espinaca (*Spinacia oleracea*), tomate (*Solanum lycopersicum L.*) y maíz (*Zea mays*) cultivadas en suelo enmendado con biosólidos o en suelo con una elevada contaminación. Una predominante acumulación de los compuestos de cadena larga se

observó en las raíces mientras que los compuestos de cadena corta se acumulaban principalmente en las partes aéreas.

Por último, se llevó a cabo una evaluación del riesgo asociado a la aplicación agrícola de biosólidos como enmienda orgánica, en relación a dos sustancias seleccionadas: PFOS y ácido perfluorooctanoico (PFOA). Los resultados de esta evaluación sugieren que en las condiciones ensayadas, el riesgo se considera adecuadamente controlado.

SUMMARY

SUMMARY

Perfluorinated alkyl substances: PFSA, PFCAs, FOSA, N-MeFOSA y N-EtFOSA. Development of analytical methodologies and application to environmental samples

The perfluorinated alkyl substances (PFASs), in particular perfluoroalkylsulfonates (PFSA), perfluoroalkylcarboxylates (PFCAs) and perfluorooctanesulfonamides (FOSAs), include a group of emerging pollutant substances which present characteristics of persistence, they are globally distributed in the environment and could cause adverse effects in organisms. These substances have been used for over 50 years in numerous industrial and commercial applications due to their unique hydrophobic, lipophobic and heat resistance properties.

Their release into the environment can occur at each stage of the fluorochemical product life cycle. They can be released during their synthesis and incorporation into the product or material, and during the distribution of the product to the users, the use of the product by consumers and the disposal.

The limited studies regarding this kind of compounds, their toxicological and bioaccumulative properties and their inclusion in the legislation on target to restrict and prohibit their commercialization and use, justify the necessity of their control and monitoring. Thus, in the present work, an effective analytical method has been developed and validated to study PFASs to trace level in environmental samples. The method consists in an extraction by agitation, ultrasonication and centrifugation techniques followed by a purification step by solid phase extraction. The determination of the perfluorinated alkyl substances of interest, including perfluoroalkylcarboxylates, perfluoroalkylsulfonates and perfluorooctanesulfonamides is performed by liquid chromatography (HPLC) interfaced with mass spectrometry (MS/MS).

It is important to point out that the wastewater treatment plants (WWTPs) are a potential source of emission of PFASs. Considering that the use of biosolids from

WWTPs in the agriculture is considered one of the most sustainable options to manage this kind of waste, their application as agricultural amendment could lead to a remobilization of these recalcitrant compounds, a transfer to the soil and a possible entry of PFASs to the food chain.

For this reason, once the analytical methodology was optimized, the PFAS content was determined in 20 biosolid samples from WWTPs distributed all over national geography. Later, the methodology developed allowed to investigate the transfer of these compounds to different environmental compartments as a result of the biosolid application as agricultural amendment in soils.

Firstly, the leaching and runoff capacities of PFASs were studied from biosolid amended soils by semi-field experiments. A high mobility potential through the soil via runoff and leachate water was showed for perfluorooctane sulfonate, PFOS. PFOS levels in runoff water were higher than those found in the leachate water. That could suggest that runoff phenomena were a preferential transport route of this compound.

Then, the presence and transfer of these pollutants in the soil-soil invertebrate system were studied by MS•3 multi species soil systems. The application of biosolids with PFAS content contributed to the increase of perfluorinated alkyl substances in the soil and the accumulation of these compounds in earthworms (*Eisenia andrei*).

Later, the transfer and distribution of PFASs in spinach (*Spinacia oleracea*), tomato (*Solanum lycopersicum L.*) and corn plants (*Zea mays*) grown in biosolid amended soils or in highly contaminated soil were investigated. A predominant accumulation of long-chain compounds in the roots and shorter-chain ones in the aerial plant parts was observed.

Finally, an evaluation of the risk associated with the agricultural application of biosolids as organic amendment related to PFOS and perfluorooctanoic acid (PFOA) was conducted. At the conditions of the experiments, the results suggest that the risks are adequately controlled.

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

Las sustancias perfluoradas engloban un grupo de contaminantes que recientemente han causado gran preocupación en la comunidad científica debido a las características de persistencia, bioacumulación y toxicidad que presentan. La limitada existencia de estudios referentes a este tipo de contaminantes revela la necesidad de desarrollar metodologías analíticas para su determinación en diferentes matrices. Por todo ello, en este trabajo de investigación, se ha desarrollado y validado la metodología necesaria para la determinación de varias sustancias perfluoradas en muestras medioambientales. La aplicación de esta metodología ha permitido investigar la transferencia de estos compuestos a distintos compartimentos medioambientales.

La presente memoria comienza con una Introducción general en la que se expone principalmente la problemática medioambiental de las sustancias perfluoradas. A continuación, se describe la Metodología Analítica utilizada en la determinación de estos compuestos, concretamente de perfluoroalquil sulfonatos, perfluoroalquil carboxilatos y perfluorooctano sulfonamidas.

En el capítulo correspondiente a Resultados y Discusión, se detallan los resultados más significativos de cada uno de los experimentos realizados, relativos a la optimización de la metodología analítica y a la transferencia de estos compuestos a distintos compartimentos medioambientales como resultado de la aplicación de biosólidos de EDAR en suelos agrícolas. También se incluye una evaluación de riesgos asociada a este tipo de práctica agrícola, para dos sustancias perfluoradas seleccionadas.

Por último, se resumen las Conclusiones de mayor relevancia para ofrecer una visión conjunta de la investigación llevada a cabo y se presenta la Bibliografía consultada y citada en la memoria de la Tesis Doctoral.

En los Anexos se incluyen los artículos científicos que constituyen esta Tesis Doctoral e información adicional de interés en relación con el trabajo presentado:

- Artículo I: “*Analysis of perfluorinated alkyl substances in Spanish sewage sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*”.

Irene Navarro, Paloma Sanz, María de los Ángeles Martínez.

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2011) 400: 1277-1286.

- Artículo II: *“Transfer of PFOS, BDE-209 and DP from biosolid amended soils to leachate and runoff water”*.

Irene Navarro, Adrián de la Torre, Paloma Sanz, Miguel Ángel Porcel, Gregoria Carbonell, María de los Ángeles Martínez.

Enviado para su publicación.

- Artículo III: *“Bioaccumulation of emerging organic compounds (perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants) by earthworms in biosolid amended soils”*.

Irene Navarro, Adrián de la Torre, Paloma Sanz, Javier Pro, Gregoria Carbonell, María de los Ángeles Martínez.

Environmental Research (2016) 149: 32-39.

- Artículo IV: *“Uptake of perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants by crop plants grown in biosolids-amended soils”*.

Irene Navarro, Adrián de la Torre, Paloma Sanz, Miguel Ángel Porcel, Javier Pro, Gregoria Carbonell, María de los Ángeles Martínez.

Environmental Research (2017) 152: 199-206.

Para la realización de este trabajo, se han propuesto dos objetivos generales (A y B), divididos a su vez en diferentes objetivos específicos que se detallan a continuación:

A) Optimización y validación de la metodología analítica para la determinación de sustancias perfluoradas en distintas matrices medioambientales. Este objetivo general incluye:

- Optimización del procedimiento de extracción y/o purificación en función de la naturaleza de la matriz estudiada: i) extracción en fase sólida, ii) extracción mediante combinación de agitación, ultrasonificación y centrifugación.

- Optimización del método de análisis instrumental mediante cromatografía de líquidos de alta presión acoplada a espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo: i) elección de la fase móvil, ii) parámetros de espectrometría de masas, iii) identificación y cuantificación.

B) Aplicación de la metodología analítica desarrollada a muestras medioambientales. Este objetivo general incluye:

- Estudio de la presencia de sustancias perfluoradas en lodos de estaciones de depuración de agua mediante la aplicación de la metodología desarrollada.
- Estudio de la capacidad de lixiviación y escorrentía de las sustancias perfluoradas mediante ensayos de semicampo, como consecuencia de la aplicación de biosólidos como enmienda agrícola en suelo.
- Estudio de la presencia y bioacumulación de sustancias perfluoradas en organismos invertebrados del suelo (*Eisenia andrei*) expuestos a suelo enmendado con biosólidos, mediante la utilización de sistemas de suelo multiespecie MS-3.
- Estudio de la transferencia y distribución de sustancias perfluoradas en plantas de espinaca (*Spinacia oleracea*), tomate (*Solanum lycopersicum L.*) y maíz (*Zea mays*) cultivadas en suelo enmendado con biosólidos.
- Evaluación del riesgo asociado a la aplicación agrícola de biosólidos en relación a PFOS y PFOA.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características de las sustancias perfluoradas

Las sustancias perfluoradas (PFAS) engloban un grupo de sustancias contaminantes emergentes que recientemente han captado la atención de la comunidad científica debido a su persistencia, distribución en el medio ambiente y a los efectos adversos que pueden causar en los organismos vivos (Clarke y Smith, 2011; Kannan, 2011).

Estas sustancias pueden agruparse en numerosas familias (Buck y col., 2011), destacándose los perfluoroalquil sulfonatos (PFSA), perfluoroalquil carboxilatos (PFCA), perfluoroalquil sulfonamidas y alcoholes fluorotelómeros (FTOH), como las principales familias actualmente objeto de estudio por su extensa distribución medioambiental. Su estructura química consta de una cadena alquil hidrofóbica de átomos de carbono de longitud variable, en la que todos o parte de los átomos de hidrógeno han sido reemplazados por átomos de flúor, y de un grupo funcional hidrofílico (ver *Figura 1.1.*).

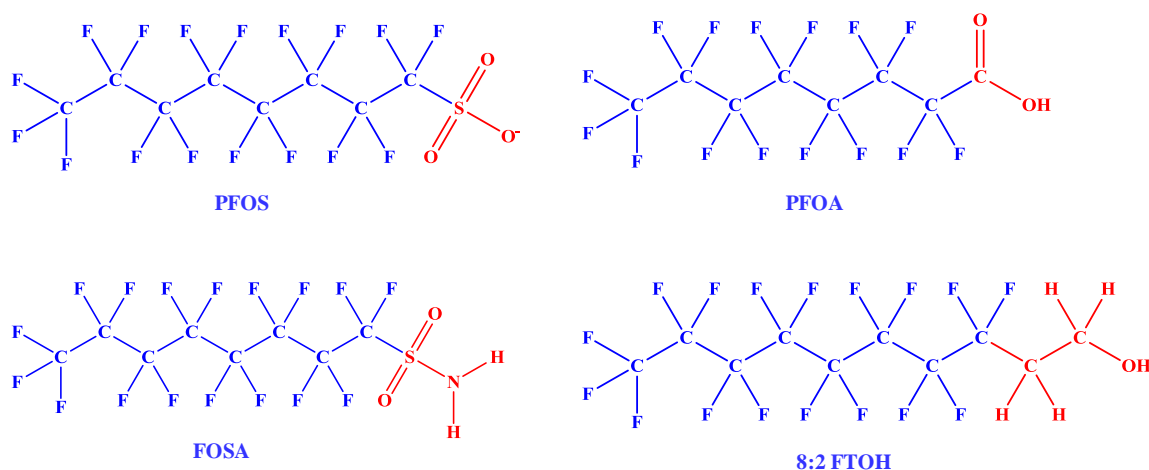


Figura 1.1. Estructura de algunas sustancias perfluoradas: PFOS (perfluorooctano sulfonato), PFOA (ácido perfluorooctanoico), FOSA (perfluorooctano sulfonamida) y 8:2 FTOH (8:2 alcohol fluorotelómero).

Las inusuales características físicas, químicas y biológicas que presentan estos compuestos en comparación con los compuestos orgánicos clorados y bromados, son debidas principalmente al enlace carbono-flúor. El flúor, que es el elemento más electronegativo de la tabla periódica, atrae hacia sí mismo los electrones del enlace químico, confiriendo una elevada fuerza y polaridad al enlace carbono-flúor (~110 kcal/mol) que contribuyen a la elevada estabilidad química de las sustancias perfluoradas (Key y col., 1997; 3M Company, 2000a). Este enlace de alta energía les hace resistentes a la hidrólisis, fotólisis, degradación microbiana y al metabolismo de vertebrados y por lo tanto, altamente persistentes en el medio ambiente (Kissa, 2001; Giesy y Kannan, 2002), pudiendo ser transportados a grandes distancias a través de la atmósfera, en fase de vapor o adsorbidos a partículas atmosféricas, o a través del agua de los ríos y de los océanos (Prevedouros y col., 2006; Armitage y col., 2009; Paul y col., 2009). Las dos sustancias perfluoradas más conocidas y estudiadas, PFOS y PFOA, son especialmente estables, pueden resistir la fotólisis directa e indirecta y tienen una vida media en agua superior a los 41 y 92 años, respectivamente (Hekster y col., 2002).

Al ser biodisponibles, son incorporados por los organismos a través de la dieta o a través de su presencia en el medio ambiente y consiguen acumularse en sus tejidos pudiéndose concentrar varios órdenes de magnitud con respecto al medio. Se encuentran mayores concentraciones en los niveles tróficos superiores, hecho que evidencia que son bioacumulativos (Martin y col., 2004a). Debido a la estructura que presentan, algunos estudios han sugerido que estas sustancias son *proteínofilicas* (Conder y col., 2008; Müller y col., 2011). A nivel de organismo, se ha observado que los tejidos con alto contenido de proteínas como el hígado y la sangre son los principales repositorios de las sustancias perfluoradas, con concentraciones de órdenes de magnitud superiores a las concentraciones detectadas en otros compartimentos biológicos (Martin y col., 2003a; Houde y col., 2006a; van de Vijver y col., 2007).

Además, son potencialmente tóxicos, pueden causar efectos adversos en los organismos y provocar toxicidad gastrointestinal, hepatotoxicidad, alteraciones en el desarrollo, carcinogénesis, disrupción en el sistema inmune y perturbaciones en el sistema hormonal (Lau y col., 2007; EFSA, 2008).

El fraccionamiento en fases de los compuestos perfluoroalcanos difiere también del relativo a los organoclorados y bromados. Mientras estos últimos son hidrofóbicos y lipofílicos, algunas sustancias perfluoradas al mezclarse con hidrocarburos y agua forman tres fases inmiscibles, indicando que sus cadenas son oleofóbicas e hidrofóbicas, lo que les confiere propiedades surfactantes (3M Company, 2000a).

La naturaleza de estas sustancias dificulta la medición y estimación de algunas de sus propiedades, siendo escasa e imprecisa la información disponible (Houde y col., 2006b; Kannan, 2011). En la **Tabla 1.1.** se detallan algunas de las propiedades físico-químicas de PFOS (en su forma como sal de potasio) y de PFOA.

Tabla 1.1. Propiedades físico-químicas de la sal de potasio de PFOS (3M Company, 2003; UNEP, 2006) y PFOA (USEPA, 2005; Arp y col., 2006).

Propiedad	K ⁺ PFOS	PFOA
Peso molecular	538 g/mol	414 g/mol
Presión de vapor	3,31 x 10 ⁻⁴ Pa	10 mm Hg (25°C)
Solubilidad en agua	519 mg/L (20 ± 0,5°C) 680 mg/L (24 - 25°C)	3,4 g/L
Punto de fusión	> 400°C	45 - 50°C
Punto de ebullición	No medible	189 - 192°C / 736 mm Hg
Coefficiente de partición n-octanol - agua (Log K _{ow})	No medible (-1,08*)	4,3**
Coefficiente de partición aire-agua (Log K _{aw})	< -5,7	-2,4**

* calculado a partir de su solubilidad en octanol y en agua (3M Company, 2003)

** valor estimado (Arp y col., 2006)

1.2. Aplicación y producción de las sustancias perfluoradas

Las propiedades hidrofóbicas, lipofóbicas y de resistencia al calor de las sustancias perfluoradas han facilitado su utilización desde los años 50 en numerosas aplicaciones industriales y comerciales, empleándose como repelentes de aguas, grasas y aceites en tableros y productos de papel; pinturas, adhesivos y productos de limpieza e higiene personal; también se han utilizado como protectores superficiales antimanchas de alfombras y materiales textiles; antiadherentes en utensilios de cocina; materiales empleados en la fabricación de semiconductores, fluidos hidráulicos para aviación, espumas contra incendios, insecticidas, herbicidas y materiales de uso médico y odontológico (Kissa, 2001; OECD, 2002). Por ejemplo, el fluoroquímico repelente antimanchas más famoso (*Scotchgard*) creado por la compañía 3M, el mayor productor de sustancias perfluoradas, se descubrió accidentalmente en 1953, cuando un compuesto experimental se derramó sobre las zapatillas de tenis de un ayudante de laboratorio (Renner, 2006). El derrame eliminó las manchas y mantuvo las zapatillas limpias. Este suceso favoreció el desarrollo de los primeros productos de limpieza fluoroquímicos, generando una familia inmensa de compuestos químicos exitosos que harían la vida cotidiana más fácil.

La **Figura 1.2.** refleja la importancia relativa de varias áreas de aplicación de PFAS en Reino Unido, como representación del uso histórico destinado de estas sustancias en un país europeo (Hekster y col., 2002). Como se puede observar, el principal tipo de aplicación corresponde al tratamiento textil y de alfombras. La utilización de estas sustancias como protector textil tiene como objetivo repeler manchas, suelo, aceite y agua. Se han utilizado en ropa de mesa o manteles, tapizado y ropa impermeable (Hekster y col., 2002).

El PFOS ha sido utilizado históricamente para el tratamiento de alfombras, concretamente en la impregnación de alfombras de fibras sintéticas, que constituyen aproximadamente el 86 % de las alfombras del mercado (Consortium ESWI, 2011). Considerando que a nivel mundial el cese de la producción más importante de PFOS, por parte de la compañía 3M, se estableció entre 2002 y 2003 y que la vida media de una alfombra es aproximadamente 14 años (entre 10 y 18 años), es muy probable que el

PFOS contenido en las alfombras se encuentre actualmente como residuo en las casas (Consortium ESWI, 2011).

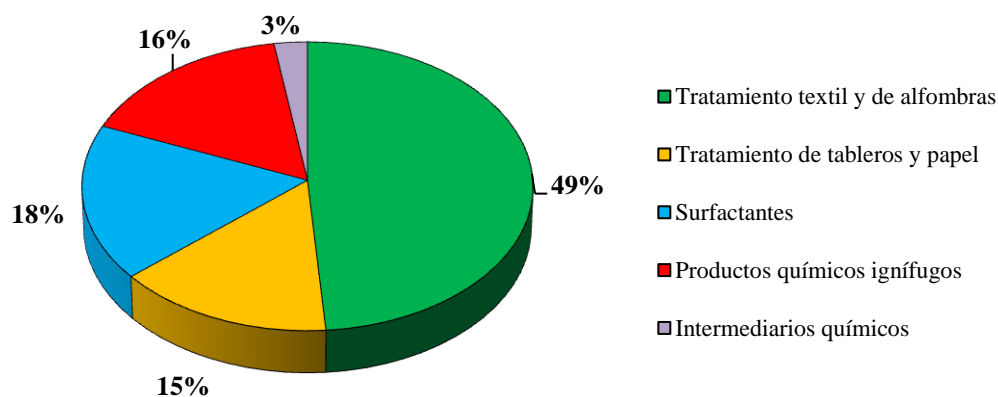


Figura 1.2. Distribución de las sustancias perfluoradas en función de su tipo de aplicación en Reino Unido.

Por otro lado, en la **Figura 1.3.** se detalla la proporción de PFAS relativa a la producción global histórica por parte de la compañía 3M, observándose que el 48 % fue destinado al tratamiento de superficies (Hekster y col., 2002).

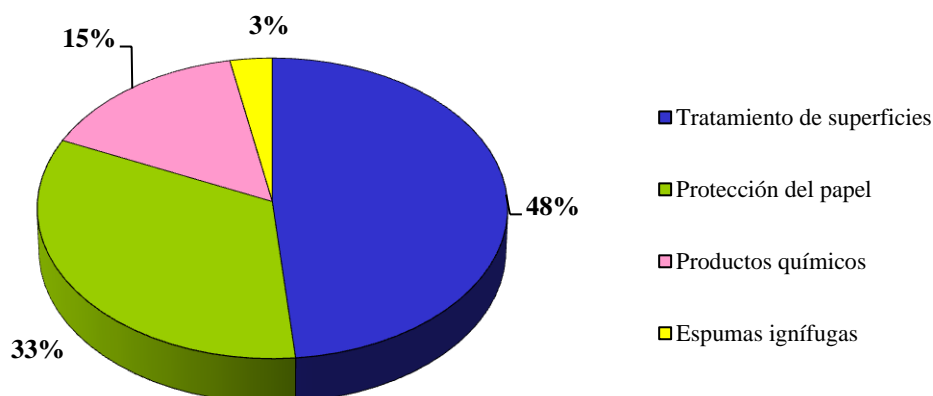


Figura 1.3. Distribución de las sustancias perfluoradas en función de su tipo de aplicación en la producción global histórica de la compañía 3M.

Para comprender mejor el comportamiento medioambiental de las sustancias perfluoradas, así como la relación entre las distintas familias, brevemente se describen

los dos principales procesos de fabricación para producir compuestos con cadenas perfluoroalquil: la fluoración electroquímica y la telomerización.

La fluoración electroquímica es una tecnología en la que el material orgánico de partida (por ejemplo, fluoruro de octano sulfonilo, $C_8H_{17}SO_2F$) se somete a una electrolisis con ácido fluorhídrico (HF) para reemplazar todos los átomos de hidrógeno por átomos de flúor. La naturaleza del proceso provoca una reorganización y fragmentación de la cadena carbonada, resultando en una mezcla de isómeros perfluorados lineales y ramificados. La proporción de las cadenas perfluoroalquil lineales y ramificadas formadas en el proceso de electrofluoración varía dependiendo de cómo se controle dicho proceso, pero aproximadamente la mezcla se compone de un 70-80 % de cadenas lineales y un 20-30 % de cadenas ramificadas en el caso de la síntesis de PFOS y PFOA (3M Company, 2000a; Benskin y col., 2010). La fluoración electroquímica de fluoruro de octano sulfonilo genera fluoruro de perfluorooctano sulfonilo (PFOSF, $C_8F_{17}SO_2F$), que es el producto intermediario primario para la síntesis de PFOS y sustancias perfluoradas derivadas como pueden ser sulfonamidas, alcoholes sulfonamidas y monómeros de acrilato sulfonamida (**Figura 1.4.**). Igualmente, la fluoración electroquímica del fluoruro de octil ($C_7H_{15}COF$) produce fluoruro de perfluorooctil ($C_7F_{15}COF$), que es el producto intermediario para la obtención de PFOA y sus sales (**Figura 1.5.**) (Hekster y col., 2002; Buck y col., 2011).

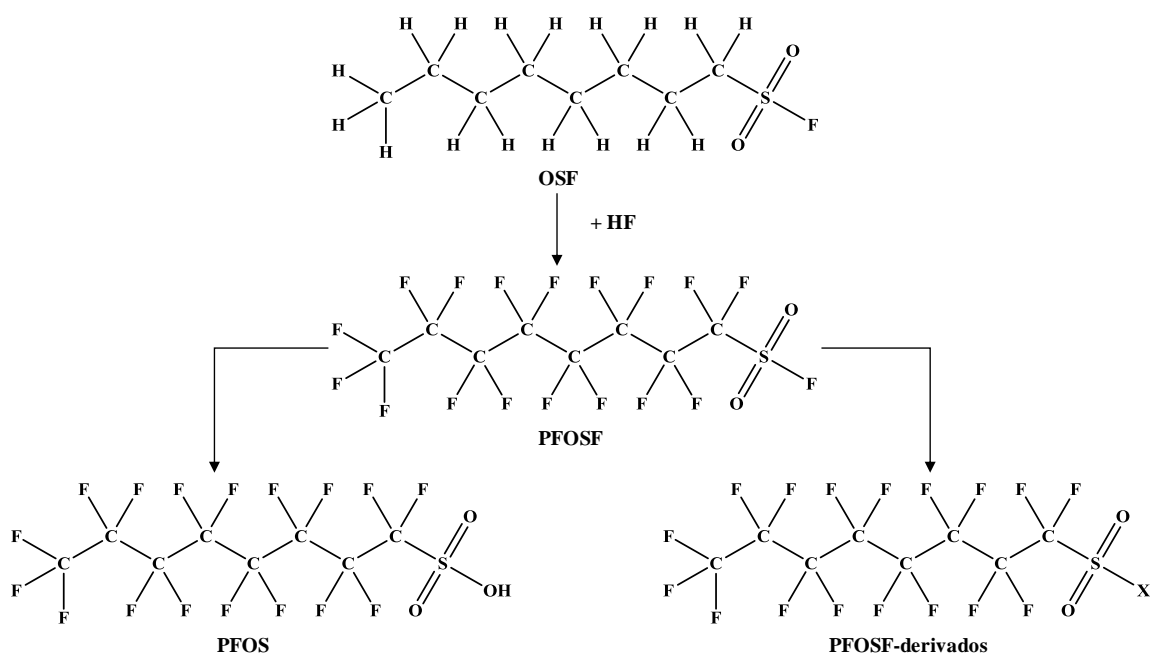


Figura 1.4. Esquema de la síntesis de PFOS y sustancias relacionadas mediante fluoración electroquímica.

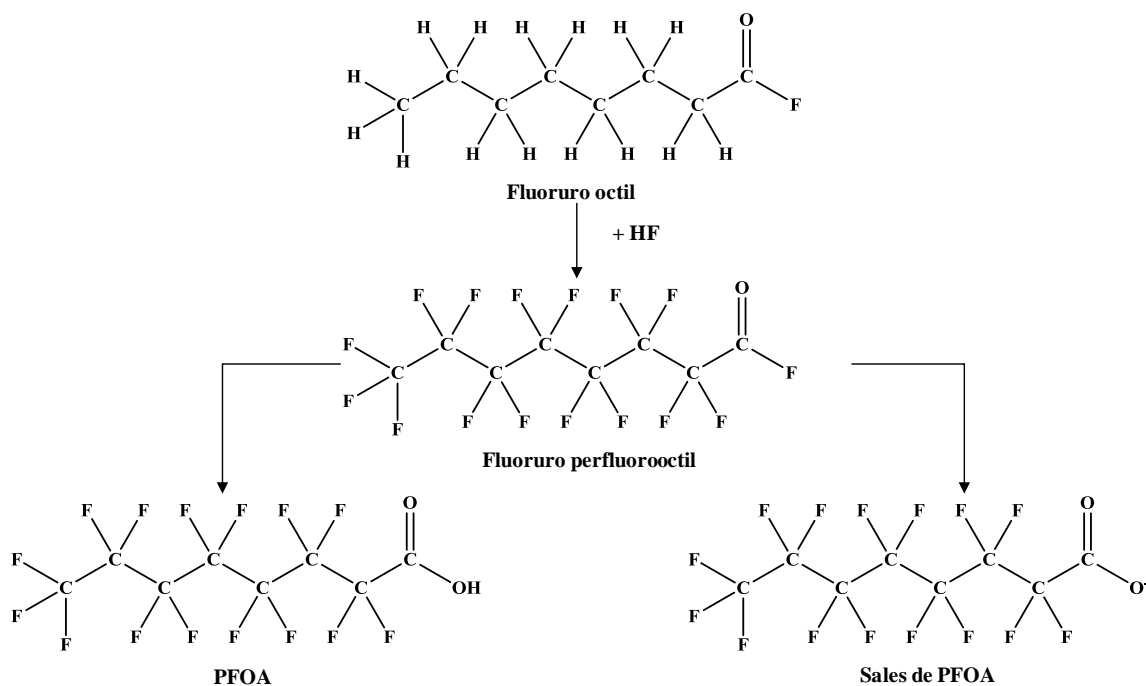


Figura 1.5. Esquema de la síntesis de PFOA y sustancias relacionadas mediante fluoración electroquímica.

La producción mundial del PFOSF por parte del mayor productor (3M) se estimó en 13.670 t entre 1985 y 2002, con un volumen máximo de producción anual en el año 2000 de 3.700 t de PFOS y sustancias relacionadas (UNEP, 2006). Hasta 2002 la producción por parte de 3M de PFOA por el método de fluoración electroquímica suponía el 80 % del mercado global (Cousins y col., 2011). A partir del año 2000 esta compañía, voluntariamente, decidió reducir gradualmente la fabricación de estas sustancias, suspendiendo alrededor del 90 % de su producción a finales de ese mismo año y cesándola completamente a principios de 2003 (3M Company, 2000b; UNEP, 2006). La presencia de estos compuestos en personas ocupacionalmente expuestas (Gilliland y Mandel, 1993, 1996; Sottani y Minola, 2002) y en el medio ambiente, fue lo que desencadenó el cese en la fabricación de estos compuestos por el método de fluoración electroquímica.

El segundo proceso de fabricación de sustancias perfluoradas más importante es la telomerización (**Figura 1.6.**). En esta tecnología, un perfluoroalquil yoduro ($C_mF_{2m+1}I$), más comúnmente pentafluoroetil yoduro (C_2F_5I), reacciona con tetrafluoroetileno (TFE, $CF_2=CF_2$) para originar una mezcla de perfluoroalquil yoduros con cadenas perfluoradas lineales más largas, que son transformadas en procesos posteriores para dar lugar a los productos finales de interés comercial, como pueden ser PFCA y fluorotelómeros alcoholes (Kissa, 2001; Buck y col., 2011).

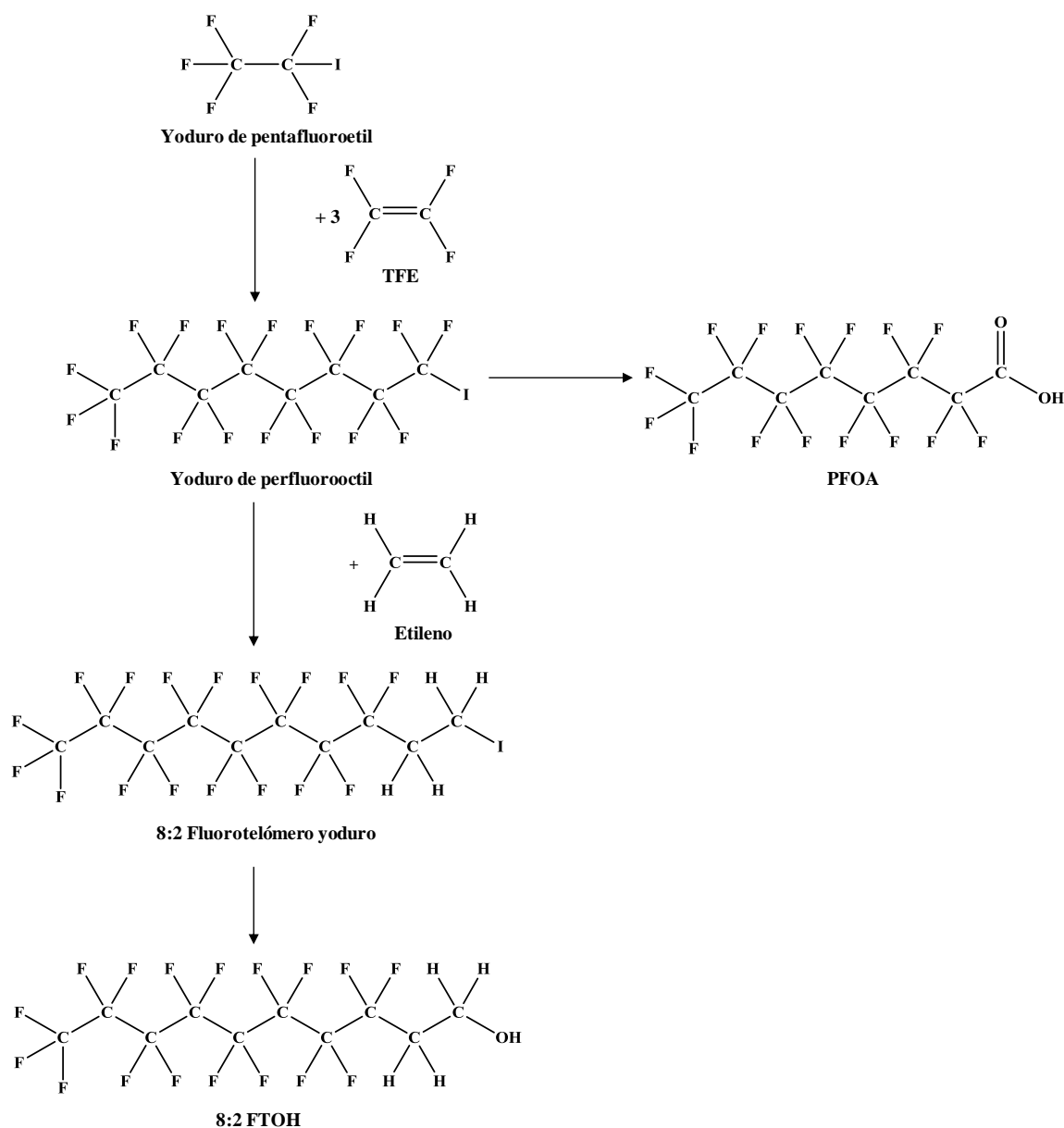


Figura 1.6. Esquema de la síntesis de PFOA, fluorotelómeros alcoholes y sustancias relacioandas mediante telomerización.

La producción global anual de PFOA fue estimada en 500 t en el año 2000, incrementándose hasta 1.200 t en 2004, lo que presumiblemente le hizo convertirse en el perfluoroalquil carboxilato más empleado (Lau y col., 2007). Por ello, en 2006, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) inició el Programa de Administración de PFOA 2010/15, en el que ocho de las principales productoras del sector se comprometieron voluntariamente a conseguir una reducción para 2010 del 95 %

de las emisiones de PFOA y sus precursores, así como de los productos que los contuvieran, manteniendo como objetivo fundamental su definitiva eliminación para 2015 (USEPA, 2006).

La legislación ha sido estricta para los productos de PFOS en los países desarrollados; la Unión Europea (European Community, 2006), Canada (Statutory Instruments Act, 2008) y USA (USEPA, 2002) han adoptado nuevas regulaciones y restricciones en el uso y liberación de PFOS y los compuestos relacionados. Sin embargo, ha existido un cambio en la producción de estas sustancias en otros países con regulaciones medioambientales menos robustas (Wang y col., 2009; OECD, 2015). Por ejemplo, en China se empezó una producción a gran escala en 2003 después del cese de producción anunciado por 3M, alcanzando una producción superior a 200 t en 2006, de las que 100 t fueron diseñadas para su exportación (POPRC, 2008; Ruisheng, 2008; Kannan, 2011).

En general, como consecuencia de las regulaciones y de los ceses de producción, las PFAS de cadena larga, considerando como tales a los perfluoroalquil sulfonatos con seis o más carbonos, los perfluoroalquil carboxilatos con siete o más carbonos, y sus precursores, han sido reemplazados por compuestos de cadena más corta que son considerados menos bioacumulativos (Conder y col., 2008; Olsen y col., 2009). Así, por ejemplo 3M continuó utilizando el proceso de fluoración electroquímica para la producción de perfluorobutano sulfonato (PFBS) en vez de PFOS (Martin y col., 2003b; Renner, 2006; Cousins y col., 2011). Sin embargo, existen evidencias de que estas alternativas de cadena corta no son siempre menos bioacumulativas, observándose una mayor incorporación, distribución y acumulación de estas sustancias por las plantas (Felizeter y col., 2014; Krippner y col., 2014; Wen y col., 2014; Navarro y col., 2017).

Existe cierta preocupación relativa a la introducción en el mercado de las sustancias alternativas, ya que estas mantienen la cadena perfluorada, por lo que siguen siendo recalcitrantes a la degradación y podrían ocasionar problemas similares a los de PFOS y PFOA. Los productos disponibles son tan diversos que resulta complicada su caracterización. Además, se tiene escasa información relativa a volúmenes de producción, usos, propiedades y efectos biológicos (Scheringer y col., 2014).

En la actualidad, las PFAS, incluyendo las sustancias alternativas, están siendo manufacturadas por un importante número de productores y regiones en el mundo. Aunque se desconocen los volúmenes de producción de estas sustancias (UNEP, 2015a; OECD, 2015), se estima una producción de 200 t anuales que equivalen al 5 % de la producción histórica de 3M (UNEP, 2015b). Por tanto, la producción de sustancias perfluoradas continúa en el presente y los futuros riesgos en humanos y fauna silvestre en el medio ambiente son difíciles de predecir (Martin y col., 2010).

1.3. Distribución ambiental de sustancias perfluoradas

La presencia de PFAS en el medio ambiente fue descrita por primera vez en 2001 (Giesy y Kannan, 2001) y desde entonces diversos trabajos han demostrado que se encuentran globalmente distribuidos en el medio ambiente: en fauna y flora (Kannan y col., 2001a; Martin y col., 2004a; Ahrens y col., 2011a; Houde y col., 2011), aire (Boulanger y col., 2005; Shoeib y col., 2006; Ahrens y col., 2011b), sedimentos (Higgins y col., 2005; Yang y col., 2011;), agua (Yamashita y col., 2005, 2008; Ericson y col., 2008; Jin y col., 2009) y humanos (Kannan y col., 2004; Olsen y col., 2011; Loi y col., 2013; Skuladottir y col., 2015).

Las sustancias perfluoradas encontradas en el medio ambiente son antropogénicas (Giesy y Kannan, 2002). Estos compuestos difieren de las moléculas organofluoradas naturales en que contienen más átomos de flúor en sus cadenas, de hecho, todas las sustancias orgánicas fluoradas producidas biológicamente contienen un único átomo de flúor (Key y col., 1997). Hasta la fecha, el destino y transporte global de las sustancias perfluoradas no está bien definido (Arvaniti y Stasinakis, 2015), pero es comúnmente aceptado que sus emisiones al medio ambiente se deben principalmente a su fabricación intencionada, uso y eliminación, a su presencia como impurezas en sustancias que son emitidas al medio ambiente y a la degradación abiótica y biótica medioambiental de sustancias precursoras (Prevedouros y col., 2006; Buck y col., 2011). Buck y col. (2011) describen las fuentes de emisión directa como emisiones a través del ciclo de vida del producto, incluyendo las emisiones desde un producto en el que las PFAS se encuentren presentes como impurezas. Por tanto, la liberación al medio ambiente puede suceder en cada etapa del ciclo de vida del producto fluoroquímico: durante la síntesis,

incorporación al producto o material, distribución, uso y eliminación final del producto como desecho (3M Company, 2000a). Por otro lado, se consideran fuentes de emisión indirecta a los procesos de formación mediante la transformación de sustancias precursoras en el medio ambiente, fauna y flora silvestre y humanos (Buck y col., 2011). Es importante señalar que la estimación de los perfluoroalquil carboxilatos que han sido emitidos al medio ambiente como consecuencia de la producción y uso de fluoropolímeros alcanza el 80 % (Prevedouros y col., 2006).

Una vez que estos compuestos son liberados al medio ambiente, se puede producir una redistribución en todo el ecosistema por medio de mecanismos ambientales de transporte y transformación (**Figura 1.7.**), pudiendo encontrarse en áreas y seres vivos distantes de la actividad humana (Martin y col., 2004a; Tao y col., 2006). Las sustancias perfluoradas presentes en la atmósfera y adsorbidas a partículas pueden depositarse en el suelo por su propio peso (deposición seca); igualmente, tanto las adsorbidas a partículas como las que se encuentran en fase de vapor pueden ser arrastradas por el agua de lluvia y alcanzar el suelo y los sistemas acuáticos (deposición húmeda). La presencia de PFAS ha sido detectada en agua de lluvia (Loewen y col., 2005; Dreyer y col., 2010) y en ambientes de islas remotas, incluyendo lagos localizados en islas (Simcik y Dorweiler, 2005; Sinclair y col., 2006b) y en el Ártico Alto (Stock y col., 2007), que sólo reciben la emisión de la atmósfera. Además, algunos de estos compuestos con presiones de vapor más altas, como algunos precursores de PFOS y PFOA, pueden volatilizarse y transportarse a través de la atmósfera (Martin y col., 2002; de Silva y col., 2004; Stock y col., 2004). Por ejemplo, los fluorotelómeros alcoholes (FTOH) presentan una vida media en la atmósfera de aproximadamente 21 días (Ellis y col., 2003) y mediante oxidación atmosférica son capaces de degradarse a PFCA (Ellis y col., 2004; Hurley y col., 2004; Wallington y col., 2006).

Las sustancias perfluoradas en general presentan alta solubilidad en agua, pero también pueden sedimentar y acumularse en los sedimentos de los sistemas acuáticos (Higgins y col., 2005; Nakata y col., 2006; Houde y col., 2008). La erosión producida por el viento, agua o cualquier otro agente, facilita el transporte de las sustancias perfluoradas unidas a partículas y la transferencia entre los distintos compartimentos medioambientales. La lixiviación mediante corrientes de agua superficial, subterránea o de lluvia puede solubilizar los compuestos contenidos en el suelo y las partículas y

transportarlos hasta un sistema acuático. Algunos estudios demuestran la presencia de PFAS en el suelo y en el agua subterránea de zonas próximas a bases militares o instalaciones de entrenamiento de bomberos donde espumas ignífugas acuosas han sido utilizadas (Backe y col., 2013; Houtz y col., 2013), incluso años después de que haya cesado la actividad en la zona (Moody y col., 2003). De hecho, el agua superficial es el principal compartimento medioambiental en el que las PFAS se acumulan y es considerado una de las rutas de transporte más importantes para su propagación y distribución global en el medio ambiente (Prevedouros y col., 2006).

Además de todo ello, es importante señalar que los fenómenos de transferencia de PFAS más preocupantes, por los efectos adversos sobre la salud que pueden generar, son la bioacumulación y la biomagnificación, puesto que suponen el transporte y concentración de estos compuestos en los seres vivos a lo largo de la cadena trófica (Kannan y col., 2001b, 2005; Martin y col., 2004c; Butt y col., 2010; Müller y col., 2011.).

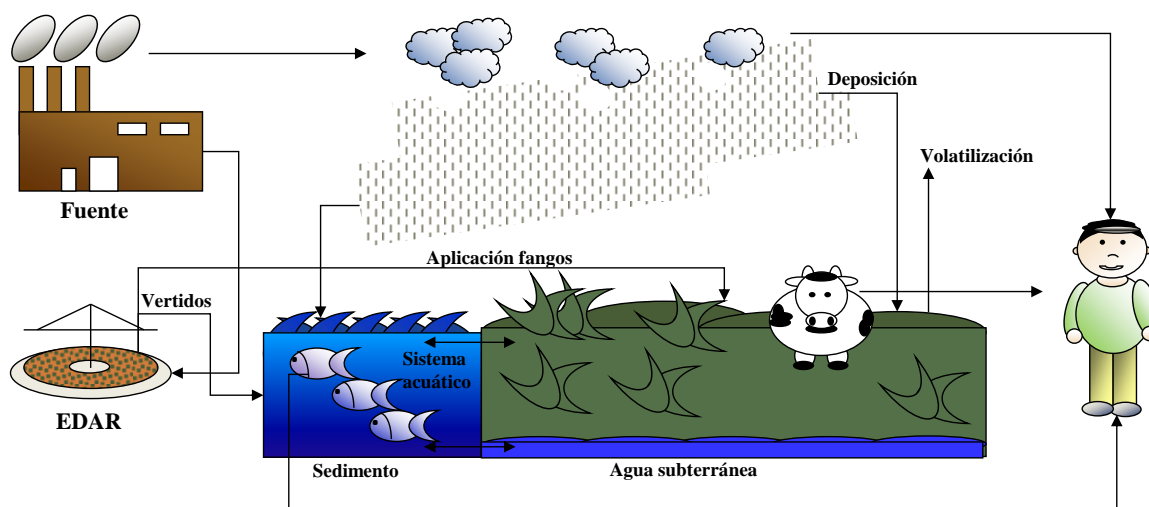


Figura 1.7. Distribución y dinámica de las sustancias perfluoradas en el medio ambiente.

1.4. Problemática ambiental de las sustancias perfluoradas relativa a biosólidos de EDAR

Las estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR) han sido identificadas como una significativa fuente de emisión para estos compuestos en diferentes compartimentos medioambientales (Sinclair y Kannan, 2006a; Pistocchi y Loss, 2009; Ahrens y col., 2011d; Eschauzier y col., 2013). Existen trabajos que demuestran que los procesos de tratamiento de aguas residuales actuales no eliminan adecuadamente la presencia de PFAS en la corriente residual (Sinclair y Kannan, 2006a; Loganathan y col., 2007; Shivakoti y col., 2010; Sun y col., 2011a; Ahrens y col., 2011d), lo que ha incentivado el estudio de métodos de tratamiento físico-químico avanzado para mejorar su eliminación (Tang y col., 2012; Appleman y col., 2013; Yao y col., 2014; Arvaniti y col., 2015).

Los lodos procedentes de aguas residuales, también llamados biosólidos, constituyen el principal residuo sólido generado en los procesos de tratamiento de aguas residuales (Aparicio y col., 2009). Son generalmente producidos como resultado de procesos de sedimentación en todo el tratamiento (primario y secundario) de aguas residuales. Este tipo de residuo, con más de 95 % de humedad, puede someterse a diferentes tratamientos para reducir su masa y volumen, estabilizar la fracción orgánica, desinfectarlo o adecuarlo a su destino final (Roig y col., 2012). En España, los sistemas de tratamiento más utilizados son la digestión anaerobia, representando hasta un 68 %, la digestión aerobia (14 %) y la estabilización química (8 %). Un 8 % de los mismos no se somete a estabilización (MARM, 2009; Roig y col., 2012). Actualmente, la tendencia de introducir post-tratamientos con objeto de mejorar las propiedades del biosólido, como por ejemplo el secado térmico y el compostaje, ha aumentado, utilizándose estos en el 14 y 10 % de los casos, respectivamente (Roig y col., 2012).

A pesar de la elevada solubilidad de las PFAS en agua (Sinclair y Kannan, 2006a; Sun y col., 2011a), su detección en biosólidos procedentes de EDAR ha sido también documentada (Navarro y col., 2011; Sun y col., 2011b; Venkatesan y Halden, 2013; Arvaniti y Stasinakis, 2015). Debido a la estructura que presentan estos compuestos, el mecanismo de adsorción de PFAS a la superficie del lodo puede basarse en interacciones

hidrofóbicas y electrostáticas (Higgins y Luthy, 2006; Arvaniti y Stasinakis, 2015). La hidrofobicidad de estos compuestos otorgada por la cadena hidrofóbica perfluorada es un parámetro importante que influye en la adsorción en el lodo (Milinovic y col., 2016), de hecho, la capacidad de adsorción aumenta al incrementarse la longitud de la cadena perfluoroalquil (Zhou y col., 2010). Asimismo, desde el punto de vista de la interacción electrostática, un valor de pH bajo provoca que las sustancias perfluoradas se desprotonen y la forma aniónica predomine, lo que podría generar una repulsión electrostática por parte de la superficie del lodo cargado negativamente. Sin embargo, en estas condiciones, algunos cationes presentes en el lodo como Ca^{2+} y Mg^{2+} pueden actuar como puentes iónicos y mediar una interacción electrostática entre las PFAS y la superficie del lodo (Arvaniti y col., 2014; Zhou y col., 2010).

Los biosólidos procedentes de EDAR localizadas en las proximidades de industrias que han utilizado PFAS, como por ejemplo fábricas de enchapado metálico, fábricas de papel, cartón y embalajes o plantas textiles, han podido contener elevadas concentraciones de PFAS (Lindstrom y col., 2011; Consortium ESWI, 2011). Incluso en el caso en el que las industrias paren el uso y producción de PFAS, la naturaleza persistente de estos compuestos en combinación con sus propiedades surfactantes podrían causar una significativa concentración de PFAS años después. Por ello, los biosólidos, podrían ser considerados una de las más importantes fuentes secundarias de estos compuestos, ya que no solo pueden acumular PFAS que actualmente han sido utilizadas sino también aquellas que han sido emitidas en el pasado (Consortium ESWI, 2011).

La actual política de residuos de la Unión Europea está basada en evitar, reusar, reciclar y recuperar los residuos lo máximo posible (European Community, 2005). La utilización de biosólidos en la agricultura es considerada una de las opciones más sostenibles para gestionar este tipo de residuos procedentes de EDAR. La utilización de la fracción orgánica de los biosólidos, como enmienda agrícola, ofrece beneficios y riesgos aceptables tanto al suelo como a las plantas (Iglesias y Pérez-García, 1989; Walter y col., 2000; Singh y Agrawal, 2008) y constituye una de las mejores salidas medioambientalmente sostenible de los residuos. Se estima que el 40 % de los biosólidos producidos en Europa es utilizado como fertilizante en la agricultura (European Commission, 2010). Sin embargo, las tasas de reciclado del lodo en la agricultura varían

enormemente entre los países miembros de la Unión Europea. Por ejemplo, aproximadamente 1.205.000 t de lodo fueron producidas en España durante 2010 y aproximadamente 995.000 t fueron recicladas en la agricultura, lo que equivale al 82 % del lodo producido (Eurostat, 2015).

Según la regulación española, solo el lodo que ha sido sometido a un tratamiento biológico, químico o térmico, a un almacenaje durante un periodo de tiempo largo u otro proceso apropiado para reducir significativamente su fermentabilidad y posibles efectos peligrosos sobre la salud como resultado de su uso, puede ser aplicado a la agricultura (MAPAMA, 1990). Tanto España como los distintos Estados de la Unión Europea han planteado la revisión de la legislación relativa a la aplicación de residuos sólidos urbanos (RSU) compostados, Directiva 86/278/CEE (European Economic Community, 1986), y lodos de EDAR, *2nd Draft of Biological Treatment of Biowaste* (European Commission, 2001), en suelo con fines agrícolas, al objeto de establecer nuevos límites para las sustancias consideradas inicialmente e incrementar el número de compuestos legislados, principalmente en lo que respecta a nuevos compuestos orgánicos emergentes. En base a esto, la Unión Europea propuso valores límites de concentración para metales pesados y compuestos orgánicos incluyendo algunos contaminantes orgánicos persistentes (COP) como policlorobifenilos o policlorodibenzo-*p*-dioxinas y policlorodibenzofuranos para el uso de lodos en agricultura (European Union, 2000). Algunos países europeos han fijado límites de concentración de algunos contaminantes orgánicos, pero los contaminantes regulados y los límites fijados son diferentes de unos países a otros, generando complejidad y controversia al respecto (Aparicio y col., 2009). En el caso de las PFAS, un valor límite para la suma de perfluorooctano sulfonato (PFOS) y ácido perfluorooctanoico (PFOA) de 100 µg/kg m.s. (masa seca) ha sido establecido en Alemania para biosólidos usados en agricultura (Grumping y col., 2007; UBA, 2009).

Por todo ello, la aplicación de biosólidos como enmienda agrícola podría causar una removilización de estos compuestos recalcitrantes (Schröder, 2003), transfiriéndose al suelo (Sepulvado y col., 2011) y constituyendo una posible entrada de las sustancias perfluoradas a la cadena trófica (Kannan, 2011; Lindstrom y col., 2011). Este hecho evidencia la necesidad de evaluar la presencia de las sustancias perfluoradas en biosólidos con objeto de poder realizar una apropiada gestión de los mismos.

1.5. Legislación relativa a las sustancias perfluoradas estudiadas y su posible repercusión en el medio ambiente

En los países desarrollados se han tomado medidas administrativas en referencia a las sustancias perfluoradas, adoptándose nuevas regulaciones y restricciones en el uso y liberación de algunos de estos compuestos.

En 2003, PFOS se incluyó en la lista de compuestos químicos de acción prioritaria del Convenio OSPAR, por sus siglas en inglés, *Oslo-Paris Convention for the Protection of the Marine Environment of the North East Atlantic*, (OSPAR Commission, 2006, 2011).

En la Unión Europea, a través de la Directiva 2006/122/CE que enmienda la Directiva 76/769/CEE relativa a la restricción en la comercialización y uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos, se establecieron restricciones en la comercialización y uso de PFOS (European Community, 2006). En 2009 esta directiva fue integrada en el Reglamento REACH, (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas) (European Community, 2009).

Por otro lado, en 2008, el Gobierno de Canadá estableció una propuesta de eliminación de PFOS y sus sales, incorporándolos en un listado de sustancias conocido como “*Virtual Elimination List*” (Statutory Instruments Act, 2008).

A estas regulaciones, se añade la inclusión de PFOS, sus sales y el fluoruro de perfluorooctano sulfonilo (PFOSF) en el Anexo B del Convenio de Estocolmo (COP, 2009). El Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP, 2001), que entró en vigor en España en 2004, establece un procedimiento para la inclusión de nuevos candidatos COP para aquellos compuestos químicos que presenten las características de persistencia, bioacumulación, potencial de transporte a larga distancia en el medio ambiente y efectos adversos sobre la salud pública y el medio ambiente. En mayo de 2009, se acordó la inclusión de nueve nuevos compuestos entre los que se encontraba PFOS, sus sales y PFOSF. La inclusión en el Anexo B de PFOS implica la restricción de su producción y uso. Este hecho ha supuesto su introducción en

estudios de vigilancia de COP para determinar y evaluar su distribución global en el medio ambiente.

Respecto a los ácidos perfluoroalquil carboxílicos, los PFCA de cadena larga (en concreto de C₁₁-C₁₄) fueron identificados en 2012 como sustancias químicas muy persistentes y bioacumulativas, incluyéndose en la Lista de sustancias candidatas extremadamente preocupantes en procedimiento de autorización, bajo el reglamento REACH (ECHA, 2012). Además, Alemania y Noruega propusieron la restricción de la fabricación, uso y comercialización de PFOA, sus sales y las sustancias que pueden degradar a PFOA, siendo también incluidas en la Lista de sustancias candidatas extremadamente preocupantes, bajo el reglamento REACH (ECHA, 2013; 2014; 2015). Adicionalmente, el Organismo Noruego para el Medio Ambiente publicó una enmienda al reglamento nacional de los productos de consumo por la que se prohibió el uso del PFOA en productos de consumo y textiles. La norma comenzó a aplicarse el 1 de junio de 2014. El periodo de transición, que permitirá la importación y venta de productos fabricados antes del 1 de junio, durará hasta el 1 de enero de 2018 (UNEP, 2015a).

Además, PFOA ha sido propuesto para su posible incorporación en el Convenio de Estocolmo (UNEP, 2015a), ya que existen pruebas suficientes de que cumple los criterios de selección especificados en el Anexo D del Convenio (POPRC, 2015).

En general, como consecuencia de las regulaciones y los ceses de producción, se ha observado una disminución en los niveles de PFOS y PFOA en humanos (Harada y col., 2010; Glynn y col., 2012; Okada y col., 2013; Yeung y col., 2013a) y en la fauna (Ahrens y col., 2011a; Gebbink y col., 2011; Rüdél y col., 2011; Rigét y col., 2013; Letcher y col., 2015). Sin embargo, los niveles de PFCA de cadena larga se siguen manteniendo en humanos (Kato y col., 2011; Yeung y col., 2013b) y en la fauna se mantienen (Gewurtz y col., 2012; Rigét y col., 2013) o incluso se incrementan (Ahrens y col., 2011a; Gebbink y col., 2011; Reiner y col., 2011b; Roos y col., 2013).

Paralelamente, en los últimos años, se ha observado un incremento en el medio ambiente de algunas de las sustancias alternativas utilizadas, como el perfluorobutano sulfonato (PFBS) o el ácido perfluorobutanoico (PFBA); detectándose estos en la fauna

(Ahrens, 2011c), en el agua superficial (Lange y col., 2007; Möller y col., 2010), en la nieve (Kirchgeorg y col., 2013) y en el aire (Weinberg y col., 2011; Ahrens y col., 2012).

METODOLOGÍA ANALÍTICA

2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

2.1. Introducción

El análisis de sustancias químicas perfluoradas requiere una metodología bien definida. Su complejidad se debe fundamentalmente a la necesidad de analizar una gran variedad de matrices, a veces de compleja naturaleza, en las que estos compuestos se encuentran a nivel traza, generalmente, en un intervalo de ppb (ng/g) o ppt (pg/g), junto con un gran número de sustancias interferentes que suelen presentarse en concentraciones más elevadas.

A todo ello se le añade una serie de problemas que se deben tener en consideración para el diseño de la metodología, como son las particulares propiedades físico-químicas de estos compuestos, la dificultad de la separación cromatográfica de los isómeros estructurales, los problemas de supresión iónica durante su medida y sobre todo, la posible contaminación de las muestras durante todas las etapas del procedimiento analítico (de Voogt y Sáez, 2006; Houde y col., 2006b; Prevedouros y col., 2006; Berger y col., 2011; Trufelli y col., 2011). Aunque los métodos analíticos para PFAS han evolucionado a lo largo del tiempo, muchos retos, incertidumbres y problemas todavía se mantienen (Berger y col., 2011).

En consecuencia, la metodología necesaria para la determinación de estos compuestos debe ser sensible, selectiva, específica, exacta y precisa para la obtención de datos fiables (Jahnke y Berger, 2009).

Actualmente, la principal metodología analítica empleada en el análisis de estas sustancias, capaz de proporcionar resultados satisfactorios, se fundamenta en el uso de procedimientos de extracción y purificación selectivos, en combinación con una separación de los distintos compuestos por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) y una detección mediante espectrometría de masas de baja resolución (principalmente con analizador de triple cuadrupolo o trampa de iones, MS/MS).

Por tanto, en este tipo de metodología analítica se pueden diferenciar las siguientes etapas principales:

- Preparación y tratamiento de la muestra.
 - Pre-tratamiento.
 - Extracción.
 - Purificación.
- Análisis mediante HPLC-MS/MS.

En los apartados siguientes se detallan los distintos procedimientos que se utilizaron para la realización de los trabajos descritos en esta memoria.

2.2. Preparación y tratamiento de la muestra

2.2.1. Pre-tratamiento

La preparación de la muestra en ocasiones comienza con una etapa de pre-tratamiento que engloba una serie de pasos destinados a facilitar la extracción y separación de los compuestos de interés de la matriz objeto de estudio. Esta etapa, que en algunos casos no es necesaria, depende de la naturaleza de dicha matriz.

En el presente trabajo se han analizado matrices de distinta naturaleza y, por tanto, se han empleado los procedimientos de pre-tratamiento necesarios en cada caso. Se han analizado muestras sólidas como biosólidos procedentes de EDAR, suelos, tejidos de plantas de espinaca (*Spinacia oleracea*), tomate (*Solanum lycopersicum L.*) y maíz (*Zea mays*) y organismos invertebrados del suelo (*Eisenia andrei*), y muestras líquidas como aguas de lixiviación y de esorrentía.

Los procedimientos de pre-tratamiento utilizados para muestras sólidas consistieron en un secado al aire a temperatura ambiente, en el caso de biosólidos y suelos, y liofilización a baja temperatura, -50 °C, durante 24 horas en un liofilizador Cryodos-50, Telstar Instrument para los tejidos de plantas y lombrices. A continuación, en los casos necesarios, se llevó a cabo un proceso de molienda para pulverizar la matriz lo máximo posible y aumentar así la superficie de contacto con el disolvente extractante.

El pre-tratamiento realizado en las muestras líquidas (aguas de lixiviación y esorrentía) consistió en una filtración para retirar las partículas en suspensión.

2.2.2. Extracción

La etapa de extracción tiene por objeto separar los analitos contenidos en la muestra, transfiriéndolos con el mayor rendimiento posible al disolvente adecuado. Como sucede con la etapa de pre-tratamiento, el procedimiento de extracción depende del tipo de matriz considerada.

En el caso de muestras líquidas como pueden ser agua procedente de ríos, océanos e influentes y efluentes de EDAR, la técnica de extracción de PFAS más empleada es la extracción en fase sólida, SPE, (Jahnke y Berger, 2009). En el caso de muestras sólidas como suelos, sedimentos, lodos procedentes de EDAR, etc. se emplea principalmente la combinación de técnicas de agitación, sonicación y centrifugación para la extracción de los compuestos de interés (Higgins y col., 2005; Powley y col., 2005; Ruowei y Kaimin, 2010), aunque otras técnicas como la extracción mediante líquidos presurizados, PLE, (Llorca y col., 2011) y la extracción asistida por ultrasonidos focalizados, FUSLE, (Martínez-Moral y Tena, 2013) han sido también utilizadas.

2.2.2.1. Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida se fundamenta en la utilización de un adsorbente (fase sólida o fase estacionaria) que permita la retención selectiva de los analitos y su recuperación mediante la elución con el disolvente apropiado. Es una técnica que ha sido desarrollada como alternativa a la extracción líquido-líquido para la separación, purificación, concentración y/o cambio de disolvente de contaminantes en muestras líquidas (Ahmed, 2001). Se puede utilizar directamente como técnica de extracción para muestras líquidas o como método de purificación de extractos. Las etapas básicas que constituyen la extracción en fase sólida son: acondicionamiento del adsorbente, incorporación de la muestra, lavado del adsorbente y elución de los analitos de interés. Las principales ventajas de este método de extracción son el bajo consumo de disolvente, el reducido tiempo de preparación de la muestra y una buena sensibilidad y repetibilidad.

Sin embargo, también puede presentar algunas desventajas como por ejemplo posibles problemas de colapso o ruptura del cartucho de SPE.

En este trabajo, la fase estacionaria empleada para la extracción y concentración de PFAS fue Oasis WAX (500 mg, 6 mL) suministrada por Waters (Milford, MA, USA). Este adsorbente presenta una naturaleza polimérica mixta funcionando como fase de intercambio aniónico débil y fase reversa, lo que proporciona una gran selectividad y especificidad para retener los compuestos estudiados (Lindström y col., 2009).

La optimización de la técnica permitió obtener los compuestos estudiados de la forma más selectiva y cuantitativa posible.

Esta técnica ha sido utilizada para la extracción de PFAS en matrices líquidas (aguas de lixiviación y escurrentía) y para la purificación y/o concentración de PFAS presentes en extractos procedentes de una extracción sólido-líquido (**Figura 2.1.**).

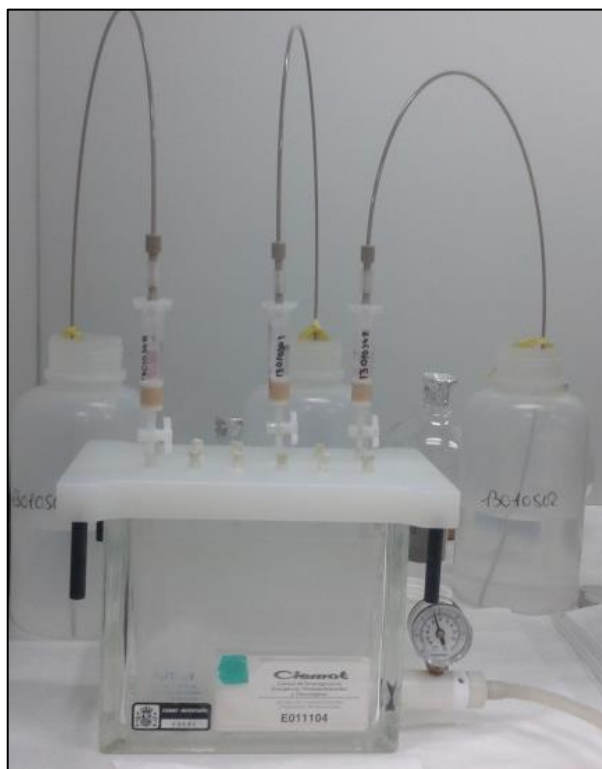


Figura 2.1. Sistema de extracción en fase sólida utilizado en el análisis de PFAS.

2.2.2.2. Extracción mediante combinación de agitación, ultrasonicación y centrifugación

La extracción mediante agitación y ultrasonicación es una técnica simple utilizada para matrices sólidas, en la que la muestra se homogeneiza, se sumerge en un disolvente orgánico apropiado y se somete a la acción de un baño de ultrasonidos. La eficiencia de la extracción depende de la polaridad del disolvente, la homogeneidad de la matriz y el tiempo de agitación y ultrasonicación (Hess y col., 1995). Esta técnica es fácil de utilizar, no requiere una instrumentación compleja, y puede proporcionar una buena recuperación de los analitos estudiados (Valsecchi y col., 2013). Sin embargo, puede ser necesario realizar sucesivas extracciones, lo que puede aumentar el volumen de disolvente utilizado provocando la dilución de los extractos y puede requerir una posterior filtración (Ahmed, 2003).

En el presente trabajo se ha empleado la extracción sólido-líquido mediante combinación de agitación, ultrasonicación y centrifugación para las matrices sólidas (bisólidos, suelos, tejidos de plantas y lombrices). Los principales disolventes seleccionados como extractantes, por proporcionar buenos rendimientos en el proceso, han sido metanol (para biosólidos y suelos) y acetonitrilo (para tejidos de plantas y lombrices). La extracción sólido-líquido utilizando acetonitrilo como disolvente extractante es una de las técnicas más utilizadas en el análisis de PFAS en muestras biológicas (Malinsky y col., 2011; Valsecchi y col., 2013) y permite disminuir el efecto matriz a niveles despreciables (Powley y col., 2008). Los disolventes utilizados fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España).

2.2.3. Purificación

La etapa de purificación permite eliminar y separar los compuestos de interés de aquellos elementos coextraídos que pueden constituir una fuente importante de interferencias en la determinación mediante HPLC-MS/MS.

En esta etapa, se ha utilizado principalmente carbón grafitizado dispuesto en cartuchos de SPE (EnviCarb; 500 mg, 6 mL) proporcionados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El carbón grafitizado adsorbe compuestos mediante una interacción dispersiva con electrones π . En las PFAS, los electrones π se encuentran fuertemente

asociados debido a la elevada electronegatividad de los átomos de flúor y por ello, no interaccionan con el adsorbente. Sin embargo, los compuestos con cierto grado de aromaticidad interaccionarán fuertemente con el carbón grafitizado, quedando retenidos en el cartucho de SPE y permitiendo una purificación eficaz (Powley y col., 2005; Valsecchi y col., 2013). El uso de carbón grafitizado disminuye la supresión iónica al eliminar de una forma efectiva los constituyentes de la matriz (de Voogt y Sáez., 2006).

En ocasiones, ha sido necesaria la combinación de carbón grafitizado y fase estacionaria Oasis WAX para completar la purificación y concentración de los analitos del extracto.

2.3. Análisis instrumental

El análisis mediante HPLC-MS/MS proporciona la separación cromatográfica de los distintos compuestos, su identificación y detección.

2.3.1. Cromatografía de líquidos de alta presión

La separación de los componentes de una mezcla se basa en las diferentes interacciones establecidas entre cada sustancia presente en la muestra y la columna cromatográfica. Las sustancias a analizar se distribuyen entre dos fases inmiscibles, la fase estacionaria (sólida) de la columna cromatográfica y la fase móvil (líquida) aplicada a alta presión. Los componentes que se desean separar deben ser solubles en la fase móvil y capaces de interaccionar con la fase estacionaria ya sea disolviéndose, adsorbiéndose, o reaccionando con ella. Generalmente, para el análisis de sustancias perfluoradas se emplea una fase estacionaria apolar, como por ejemplo sílice modificada con octadecil (C18) y una fase móvil de polaridad moderada.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en un sistema de cromatografía de líquidos Varian 212 LC acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo Varian 320 MS (Varian, CA, USA) (*Figura 2.2.*).



Figura 2.2. Sistema Varian 212 LC - 320 MS utilizado en el análisis de PFAS.

Durante la realización de los trabajos presentados en esta memoria, para conseguir la separación cromatográfica de las sustancias perfluoradas se utilizaron dos tipos de columnas analíticas: una columna Varian Polaris C18 A (50 mm x 2,0 mm y 3 μ m de diámetro de partícula) proporcionada por Varian (Varian, CA, USA) y una columna ACE 3 C18-PFP (50 mm x 2,1 mm y 3 μ m de diámetro de partícula) suministrada por Symta (Symta S.A.L. Madrid, España). La columna ACE C18-PFP combina los mecanismos de separación propios de una fase octadecil (C18) y de una fase pentafluorofenil (PFP), mejorando la selectividad, reproducibilidad y resolución de la separación de los compuestos estudiados. Aunque la fase C18 es ampliamente utilizada en la separación cromatográfica de PFAS (Villagrasa y col., 2006), la fase PFP también ha sido aplicada a este tipo de análisis (Reiner y col., 2011a). La fase C18-PFP, al igual que la fase perfluorooctil, puede prevenir el efecto de las interferencias de la matriz en comparación con la fase C18 (Ballesteros-Gómez y col., 2010; Valsecchi y col., 2013).

Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas para conseguir una buena separación de los compuestos estudiados y la mejor relación señal/ruido (S/N), evaluándose la influencia de los principales parámetros como son, la naturaleza de la fase móvil y la temperatura del horno.

2.3.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas permite la identificación de compuestos desconocidos, la cuantificación de compuestos conocidos, y la elucidación de la estructura y propiedades químicas de las moléculas. Se fundamenta en el diferente comportamiento de los iones generados en la fuente de ionización al atravesar campos eléctricos y magnéticos. Dichos iones son separados en función de su relación masa/carga (m/z) y detectados posteriormente.

El análisis instrumental de sustancias perfluoradas se ha llevado a cabo mediante diferentes técnicas como resonancia magnética nuclear (Moody y col., 2001; Arsenault y col., 2008), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Alzaga y Bayona, 2004; de Silva y Mabury, 2004; Scott y col., 2006; Langlois y col., 2007) o cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas (funcionando en modo simple, MS, o en tándem, MS/MS) (van Leeuwen y col., 2006; Benskin y col., 2007; Reiner y col., 2011a). Sin embargo, a pesar de las distintas técnicas exploradas, la técnica predominante actualmente es la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (Villagrasa y col., 2006; Jahnke y Berger, 2009; Weiss y col., 2013; Reiner y col., 2015).

Para el desarrollo de esta investigación, como se ha comentado anteriormente, el análisis de las sustancias perfluoradas se realizó mediante un sistema de cromatografía de líquidos Varian 212 LC acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo Varian 320 MS (Varian, CA, USA). La ionización de los analitos se llevó a cabo mediante una fuente de *electrospray* (ESI) trabajando en modo negativo y la adquisición se realizó en modo MRM (por sus siglas en inglés, *Multiple Reaction Monitoring*).

El acoplamiento del cromatógrafo de líquidos con el espectrómetro de masas se realiza a través de la interfase o fuente de ionización de electronebulización o *electrospray*. De este modo, una vez conseguida la separación cromatográfica de los analitos, se aplica un alto voltaje para crear un campo eléctrico que genere la dispersión de la muestra en forma de aerosol de gotas con una carga eléctrica muy elevada. La disminución del tamaño de las gotas provoca la evaporación iónica y por tanto la

liberación de los iones que son dirigidos hacia el espectrómetro de masas. Los parámetros más importantes relacionados con la ionización de los analitos son: la temperatura y la presión del gas de secado (N_2), la presión del gas de nebulización (N_2), la temperatura de la cámara de ionización, el voltaje de la aguja de ionización y el voltaje del *shield*. La temperatura y presión del gas de secado y del gas de nebulización, así como la temperatura de la cámara de ionización son parámetros que influyen en la evaporación de la fase móvil y en la formación de microgotas. Por otro lado, el voltaje de la aguja de ionización influye directamente en la formación de iones y el voltaje del *shield* afecta a la entrada de los iones formados en la cámara de ionización hacia el espectrómetro de masas. La optimización de todos estos parámetros fue necesaria para asegurar una producción máxima de iones en la fuente de ionización.

Generalmente el análisis de sustancias químicas perfluoradas se lleva a cabo mediante métodos *tándem* o MS/MS en analizadores de triple cuadrupolo (Martin y col., 2004b). El analizador de triple cuadrupolo consta de tres cuadrupolos dispuestos en serie (**Figura 2.3.**). Cada cuadrupolo presenta cuatro barras o polos de sección cilíndrica o hiperbólica colocados paralelamente entre sí y equidistantes de un eje central imaginario. El primer y tercer cuadrupolo separan los iones mediante la aplicación de voltajes de corriente continua y radiofrecuencia a cada pareja de barras opuestas. De este modo, iones de masa determinada pasan por el túnel formado por las cuatro barras polares, siguiendo trayectorias oscilantes estables, mientras que las demás masas, al presentar trayectorias inestables, son desviadas fuera del conjunto de barras. El segundo cuadrupolo funciona a modo de celda de colisión, en él se introduce un gas inerte (generalmente argón) que colisiona con los iones seleccionados en el primer cuadrupolo y provoca su fragmentación. Los iones producto de la disociación son separados de nuevo en el tercer cuadrupolo y conducidos al detector. Por último, el detector monitoriza la corriente iónica y la amplifica, transmitiéndose la señal al sistema de datos donde es registrada en forma de espectro de masas (Esteban, 1993).

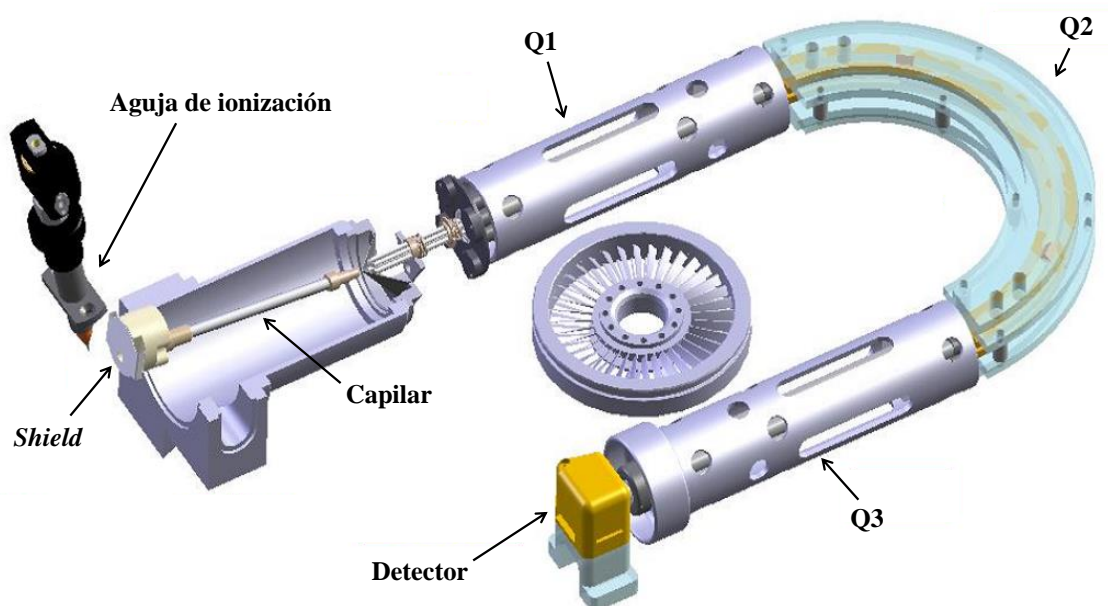


Figura 2.3. Esquema del espectrómetro de masas Varian 320 MS utilizado en el análisis instrumental de las muestras.

Los principales parámetros para la monitorización en tándem o MS/MS son el voltaje del capilar y la energía de colisión. El voltaje del capilar permite dirigir los iones hacia el primer cuadrupolo y la energía de colisión permite el fraccionamiento de los iones moleculares en la celda de colisión para la posterior detección de los iones producto en el tercer cuadrupolo. Estos parámetros fueron también optimizados para conseguir la colisión adecuada de los iones moleculares y por tanto, la formación de los iones producto.

2.3.3. Cuantificación de las sustancias perfluoradas

La cuantificación de los analitos de interés se llevó a cabo mediante la variante de patrón interno y más concretamente, mediante el método de dilución isotópica siempre que estuvieran disponibles los correspondientes patrones. La cuantificación del contenido de sustancias químicas perfluoradas mediante el método de dilución isotópica (utilizando para cada compuesto nativo, su correspondiente compuesto marcado isotópicamente)

permite una obtención de resultados exactos y fiables (Martin y col., 2004b; Jahnke y Berger, 2009; Berger y col., 2011; Valsecchi y col., 2013). La adición de las PFAS marcadas isotópicamente, previamente a la preparación y tratamiento de la muestra, permite cuantificar el contenido de estos contaminantes de una forma muy exacta, y controlar la efectividad de la recuperación de los analitos mediante la detección de las posibles pérdidas producidas durante las distintas etapas del procedimiento analítico. Se considera que los compuestos nativos y marcados presentan idénticas propiedades físico-químicas y están sometidos a los mismos efectos de matriz, por lo que se comportarán de igual forma durante todo el análisis y por consiguiente, cualquier pérdida de un compuesto nativo se verá compensada por una pérdida equivalente de su correspondiente marcado. Este método se basa en el cálculo del factor de respuesta relativo entre el compuesto marcado, añadido previamente a la extracción, y el compuesto nativo (factor RR), y el cálculo del factor de respuesta entre los compuestos marcados añadidos a las muestras antes de la extracción y el compuesto marcado añadido antes de la inyección en el HPLC-MS/MS (factor RF) (Casanovas y col., 1996).

En el presente trabajo, las curvas de calibrado se prepararon en metanol con concentraciones variables de las sustancias perfluoradas nativas: 1, 2, 10, 20, 50 y 100 pg/μL y concentración constante de los compuestos marcados (20 pg/μL). El factor de respuesta relativo en las soluciones estándar de la calibración es calculado mediante regresión lineal. Para cada compuesto no marcado relacionado con su análogo marcado se determina el factor de respuesta relativo utilizando las áreas y las concentraciones de cada solución estándar:

$$RR = \frac{C_{\text{marcado}} \times A_{\text{nativo}}}{A_{\text{marcado}} \times C_{\text{nativo}}}$$

donde C_{marcado} corresponde a la concentración del compuesto marcado isotópicamente, C_{nativo} corresponde a la concentración del compuesto nativo y A_{marcado} y A_{nativo} corresponden a las áreas obtenidas en el análisis para el compuesto marcado y nativo, respectivamente. Una media de dicho factor es utilizada para cada compuesto nativo si el factor de respuesta es constante en el intervalo de la calibración (con un coeficiente de variación menor de 20 %). Posteriormente, el valor de este factor permite el cálculo cuantitativo de los analitos presentes en la muestra.

El factor de respuesta de cada compuesto marcado relacionado con un compuesto marcado seleccionado como patrón interno, o de recuperación, es también determinado utilizando las respuestas de las áreas y las concentraciones de cada solución estándar de la calibración:

$$RF = \frac{C_{inyección} \times A_{extracción}}{A_{inyección} \times C_{extracción}}$$

donde $C_{inyección}$ corresponde a la concentración del compuesto marcado seleccionado como patrón de recuperación, $C_{extracción}$ es la concentración del compuesto marcado seleccionado para ser añadido en la preparación y tratamiento de la muestra (denominado $C_{marcado}$ en la expresión del factor RR), $A_{inyección}$ y $A_{extracción}$ corresponden a las áreas obtenidas en el análisis para los compuestos marcados del patrón de recuperación y del patrón de extracción, respectivamente. Estos factores de respuesta relativa son utilizados para calcular y controlar las pérdidas de los analitos de interés durante todo el procedimiento.

Debido a la ausencia de soluciones patrón de compuestos marcados isotópicamente para algunos de los analitos considerados, para la cuantificación y el cálculo de sus recuperaciones en algunos casos fue necesario el uso de otros compuestos marcados distintos del analito de interés (**Tabla 2.1.**). Las soluciones patrón utilizadas fueron suministradas por Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canadá).

Tabla 2.1. Relación de los compuestos evaluados con los correspondientes compuestos marcados empleados para su cuantificación y para el cálculo de su recuperación.

Compuesto	Compuesto marcado (Patrón de extracción)	Compuesto marcado (Patrón de recuperación)
PFAC-MXB	MPFAC-MXA	
PFBS	[¹³ C ₄]-PFOS	[¹³ C ₉]-PFNA
PFH _x S	[¹⁸ O ₂]-PFH _x S	[¹³ C ₉]-PFNA
PFOS	[¹³ C ₄]-PFOS	[¹³ C ₉]-PFNA
PFDS	[¹³ C ₄]-PFOS	[¹³ C ₉]-PFNA
PFBA	[¹³ C ₄]-PFBA	[¹³ C ₉]-PFNA
PFPeA	[¹³ C ₄]-PFOA	[¹³ C ₉]-PFNA
PFH _x A	[¹³ C ₂]-PFH _x A	[¹³ C ₉]-PFNA
PFHpA	[¹³ C ₄]-PFOA	[¹³ C ₉]-PFNA
PFOA	[¹³ C ₄]-PFOA	[¹³ C ₉]-PFNA
PFNA	[¹³ C ₅]-PFNA	[¹³ C ₉]-PFNA
PFDA	[¹³ C ₂]-PFDA	[¹³ C ₉]-PFNA
PFUdA	[¹³ C ₂]-PFUdA	[¹³ C ₉]-PFNA
PFD _o A	[¹³ C ₂]-PFD _o A	[¹³ C ₉]-PFNA
PFT _r DA	[¹³ C ₂]-PFDA	[¹³ C ₉]-PFNA
PFT _e DA	[¹³ C ₂]-PFDA	[¹³ C ₉]-PFNA
PFH _x DA	[¹³ C ₂]-PFDA	[¹³ C ₉]-PFNA
PFODA	[¹³ C ₂]-PFDA	[¹³ C ₉]-PFNA
FOSA	[¹³ C ₄]-PFOS	[¹³ C ₉]-PFNA
<i>N</i> -MeFOSA	<i>N</i> -d ₃ -MeFOSA	[¹³ C ₉]-PFNA
<i>N</i> -EtFOSA	<i>N</i> -d ₅ -EtFOSA	[¹³ C ₉]-PFNA

PFAC-MXB: solución estándar de compuestos nativos.

MPFAC-MXA: solución estándar de compuestos marcados.

2.4. Aseguramiento de la calidad

Uno de los problemas asociados al análisis de sustancias perfluoradas es la contaminación de fondo en los blancos analíticos (Martin y col., 2004a; Yamashita y col., 2004). Para minimizar esta posible contaminación, las conexiones y piezas de politetrafluoroetileno (PTFE) del equipo instrumental, posibles fuentes potenciales de PFAS, fueron sustituidas por polietereftercetona (PEEK). Adicionalmente, en paralelo al tratamiento de las muestras, se prepararon y analizaron blancos de laboratorio procesados de manera similar a las muestras, para monitorizar la posible contaminación producida durante los pasos de extracción y purificación. También se analizaron blancos instrumentales, constituidos por metanol 100 %, que fueron inyectados antes y después de cada muestra para controlar posibles restos de contaminación en el sistema HPLC-MS/MS. El material de vidrio se sustituyó por material de polipropileno (PP) y polietileno (PE) para evitar una posible adsorción de las sustancias perfluoradas al vidrio (Villagrasa y col., 2006).

Además de realizar las distintas modificaciones en el equipo y las actividades que se acaban de mencionar, se ha demostrado que la participación en ejercicios de intercomparación de ámbito internacional de forma frecuente permite validar y mejorar la metodología analítica para generar resultados de alta calidad (Berger y col., 2011). Así, durante el desarrollo de los trabajos presentados en esta memoria, se ha participado en diferentes ejercicios de intercomparación de ámbito internacional para la determinación de sustancias perfluoradas en matrices abióticas y bióticas:

- A) *“5th International Interlaboratory Study (ILS) on Perfluorinated Alkyl Substances (PFASs) in food and environmental samples”*, organizado por *Institute for Environmental Studies (IVM) – VU University, 2011.*
- B) *“Second Round of UNEP-coordinated Global Interlaboratory Assessment 2013”*, organizado por *Institute for Environmental Studies (IVM) – VU University, 2013.*

- C) “6th Interlaboratory Study (ILS) on Perfluorinated Alkyl Substances (PFASs) in environmental samples”, organizado por *Institute for Environmental Studies (IVM) – VU University*, 2013.
- D) “Bi-ennial Global Interlaboratory Assessment on Persistent Organic Pollutants, 3rd Round – IL2016-POP”, organizado por *Institute for Environmental Studies (IVM) – VU University*, 2016.

El factor Z representa el buen comportamiento de los resultados obtenidos por un determinado laboratorio que participa en un ejercicio de intercomparación. Este factor se define en el Protocolo Internacional Armonizado para el Perfeccionamiento de la Verificación de Laboratorios Analíticos desarrollado por la Asociación Oficial de Químicos (AOAC International), la Organización Internacional de Estandarización (ISO) y la Unión Internacional de Química Pura y Analítica (IUPAC) (Thompson y Wood, 1993) como:

$$Z = \frac{\text{resultado emitido por un laboratorio} - \text{valor medio obtenido con laboratorios participantes}}{\text{desviación estándar de la media obtenida con laboratorios participantes}}$$

Para la interpretación de los resultados se establece como criterio que valores de $|Z| \leq 2$ son satisfactorios, $2 < |Z| < 3$ son cuestionables y $|Z| \geq 3$ son insatisfactorios.

Los valores de factor Z obtenidos para las PFAS analizadas en los diferentes ejercicios de intercomparación en los que se ha participado se detallan en la **Tabla 2.2**. Como se puede observar, los resultados fueron satisfactorios ($|Z| \leq 2$) para la mayoría de los compuestos analizados.

Tabla 2.2. Factor Z obtenido para las PFAS analizadas en los diferentes ejercicios de intercomparación.

	A		B		C		D	
	Agua	SS	Agua	Agua	Sedimento	Pez	Agua*	SS*
PFBS	---	-0,83	---	2,70	0,01	0,59	---	---
PFHxS	2,69	-0,34	---	0,08	-0,66	0,23	---	0,37
PFOS	1,95	0,47	0,13	0,69	-0,81	-0,28	-0,20	0,17
PFDS	-1,87	1,19	---	---	---	---	---	---
PFBA	0,60	-1,55	---	1,24	-0,47	0,01	---	0,79
PFPeA	---	0,45	---	-0,39	---	-0,37	---	2,54
PFHxA	0,18	-0,79	---	-0,11	-0,03	-0,51	---	0,43
PFHpA	1,78	-0,29	---	0,22	-1,01	-0,67	---	1,94
PFOA	0,40	0,17	---	0,17	-0,14	0,01	---	0,44
PFNA	1,00	0,16	---	0,81	-0,51	0,44	---	0,39
PFDA	2,13	-0,08	---	-0,33	0,08	-0,60	---	0,65
PFUdA	0,70	0,24	---	-0,26	-0,57	-1,00	---	---
PFDoA	-0,80	-0,69	---	---	0,34	-0,24	---	---
PFTTrDA	---	---	---	---	-0,66	-0,86	---	---
PFTeDA	---	---	---	---	---	-0,78	---	---
FOSA	---	---	0,90	---	---	-2,37	---	1,65
MeFOSA	---	---	---	---	---	---	---	-0,41
EtFOSA	---	---	---	---	---	---	---	-1,42
PFSA	0,93	0,12	---	1,16	-0,49	0,18	---	0,27
PFCA	0,75	-0,26	---	0,17	-0,33	-0,42	---	1,17

* Factor z calculado con los resultados preliminares del ejercicio de intercomparación.

Nº Laboratorios participantes en el ejercicio de intercomparación: A (31), B (30), C (27), D (25).

SS: solución estándar.

PFSA: promedio de factor Z obtenidos para perfluoroalquil sulfonatos.

PFCA: promedio de factor Z obtenidos para perfluoroalquil carboxilatos.

La continua participación en este tipo de ejercicios permite evaluar la precisión de la metodología analítica desarrollada.

2.5. Evaluación estadística de los datos

Los resultados obtenidos se han analizado estadísticamente mediante el programa SPSS 23.0 para Windows. El ajuste de los datos a la distribución normal se ha comprobado mediante la pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. La evaluación de diferencias estadísticamente significativas entre grupos o compuestos se ha llevado a cabo mediante la prueba de t de Student (test de Student) y la prueba U de Mann-Whitney (test de U-Mann-Whitney). Las correlaciones entre matrices y parámetros se establecieron mediante la prueba de Spearman (test de Spearman).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados más relevantes obtenidos en los diferentes estudios realizados durante esta Tesis Doctoral, así como la discusión de los mismos. Los artículos correspondientes a cada uno de los experimentos realizados se encuentran adjuntos como Anexos.

3.1. Optimización y validación de la metodología para el análisis de sustancias perfluoradas en muestras medioambientales

Artículo I:

“Analysis of perfluorinated alkyl substances in Spanish sewage sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry”.

Irene Navarro, Paloma Sanz, María de los Ángeles Martínez.

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2011) 400: 1277-1286.

En este trabajo, se propuso una metodología analítica para la determinación de trece sustancias perfluoradas en lodos de estaciones de depuración de aguas residuales. La aplicación de la metodología desarrollada en veinte muestras reales demostró su eficiencia y exactitud y proporcionó por primera vez niveles de PFAS en lodos procedentes de España.

En primer lugar se procedió a una optimización de las condiciones instrumentales del sistema HPLC-MS/MS.

Respecto a las condiciones cromatográficas, la separación de los compuestos de interés se realizó mediante una columna analítica Varian Polaris C18 A (50 mm x 2,0 mm, 3 µm de diámetro de partícula). Las siguientes fases móviles fueron evaluadas para conseguir una separación analítica y una relación S/N óptimas:

- 2 mM Acetato amónico en agua Milli-Q (A) y metanol (B)
- 10 mM Acetato amónico en agua Milli-Q (A) y metanol (B)

- 2 mM Acetato amónico en agua (A) y acetonitrilo (B)
- 10 mM Acetato amónico en agua Milli-Q (A) y acetonitrilo (B)
- 0,15 % Ácido acético en agua Milli-Q (A) y acetonitrilo/metanol (50:50) con 0,15 % ácido acético en agua Milli-Q (B)
- 10 mM Acetato amónico en agua Milli-Q/acetonitrilo (90:10) (A) y acetonitrilo/metanol (50:50) (B).

La fase móvil seleccionada como óptima fue 2 mM Acetato amónico en agua Milli-Q (A) y metanol (B). El gradiente cromatográfico utilizado con esta fase móvil empieza en una concentración inicial de 5 % de B a un flujo constante de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, después se incrementa a 80 % en 5 min y después a 100 % en otros 5 min. Se mantiene constante durante 5 min y revierte a las condiciones iniciales.

Los parámetros relativos a la separación cromatográfica de los compuestos de interés, a la ionización mediante la fuente de *electrospray* y los parámetros propios del espectrómetro de masas fueron optimizados para obtener la mejor relación S/N. Los valores seleccionados como óptimos para estos parámetros y para la fase móvil elegida se indican en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Parámetros evaluados para la optimización del sistema HPLC-MS/MS.

Parámetros	Intervalo HPLC-MS/MS	Intervalo evaluado	Valor óptimo
Temperatura del horno de la columna	0 - 60 °C	25 - 55 °C	40 °C
Temperatura del gas de secado	50 - 400 °C	150 - 350 °C	270 °C
Presión del gas de secado	3 - 60 psi	20 - 30 psi	25 psi
Presión del gas de nebulización	3 - 70 psi	50 - 65 psi	55 psi
Temperatura de la cámara de ionización	0 - 65 °C	30 - 60 °C	55 °C
Voltaje del <i>shield</i>	(-)25 - (-)800 V	(-)300 - (-)600 V	(-)450 V
Voltaje de la aguja de ionización	(-)500 - (-)6000 V	(-)1000 - (-)4000 V	(-)2000 V
Presión del gas de colisión	0,2 mTorr - 2,4 mTorr	1,6 - 2,0 mTorr	1,80 mTorr

En la **Tabla 3.2.** se detallan los valores seleccionados para el voltaje del capilar y la energía de colisión para cada uno de los trece analitos de interés. Como se mencionó en el capítulo de Metodología Analítica, el voltaje del capilar es un parámetro fundamental ya que permite dirigir los iones hacia el primer cuadrupolo del espectrómetro de masas. Paralelamente, la optimización de la energía de colisión es primordial pues esta permite el fraccionamiento de los iones moleculares para la posterior detección de los iones producto en el tercer cuadrupolo.

Una vez optimizadas las condiciones instrumentales, se procedió a evaluar la calidad del análisis de sustancias perfluoradas para su aplicación a muestras reales. Para asegurar una cuantificación exacta de los compuestos se establecieron los siguientes criterios en el método instrumental: linealidad en el intervalo de cuantificación (coeficiente de determinación, $R^2 > 0,99$), repetibilidad (desviación estándar relativa, $RSD < 20 \%$), reproducibilidad ($RSD < 25 \%$) y exactitud en la medida ($> 80 \%$). Asimismo, se calcularon los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), definidos como la mínima concentración de analito que produce un pico cromatográfico con una relación señal/ruido igual a 3 o igual a 10, respectivamente.

Las rectas de calibración obtenidas en el intervalo de concentración estudiado (1 - 100 pg/ μ l) resultaron lineales para cada uno de los compuestos, con R^2 en el intervalo de 0,995 a 0,999. Los valores de RSD obtenidos para los analitos de interés en el ensayo de repetibilidad se encontraron en el intervalo de 2 a 18 % y los correspondientes al ensayo de reproducibilidad en el intervalo de 1 a 22 %, indicando una óptima variación intra e inter-ensayo. La determinación de la exactitud en la medida se llevó a cabo mediante la comparación de la concentración teórica de una solución estándar (20 pg/ μ l) y la concentración obtenida en su análisis. Los resultados mostraron una buena exactitud en la medida, obteniéndose valores en el intervalo de 84 a 99 %. Los límites de detección y cuantificación instrumentales obtenidos se encontraron en el intervalo de 0,01 a 2,22 pg y 0,02 a 7,39 pg, respectivamente.

Tabla 3.2. Lista de compuestos de interés analizados, transiciones monitorizadas, voltajes del capilar y energía de colisión.

Compuesto	Fórmula	Transiciones MS/MS monitorizadas (m/z)	Voltaje del capilar (V)	Energía de colisión (eV)
PFBS	C ₄ F ₉ SO ₃ ⁻	299 > 99	-45	30
		299 > 299	-45	30
PFHxS	C ₆ F ₁₃ SO ₃ ⁻	399 > 99	-100	35
		399 > 399	-100	35
PFOS	C ₈ F ₁₇ SO ₃ ⁻	499 > 80	-110	50
		499 > 499	-110	50
PFBA	C ₄ HF ₇ O ₂	213 > 169	-25	5
PFPeA	C ₅ HF ₉ O ₂	263 > 219	-35	10
		263 > 263	-35	5
PFHxA	C ₆ HF ₁₁ O ₂	313 > 269	-35	10
		313 > 313	-35	5
PFHpA	C ₇ HF ₁₃ O ₂	363 > 319	-35	5
		363 > 363	-35	5
PFOA	C ₈ HF ₁₅ O ₂	413 > 369	-40	10
		413 > 413	-40	5
PFNA	C ₉ HF ₁₇ O ₂	463 > 419	-40	10
		463 > 463	-40	5
PFDA	C ₁₀ HF ₁₉ O ₂	513 > 469	-40	10
		513 > 513	-40	5
FOSA	C ₈ H ₂ F ₁₇ SO ₂ N	498 > 78	-95	40
		498 > 498	-95	30
N-MeFOSA	C ₉ H ₄ F ₁₇ NO ₂ S	512 > 169	-95	25
		512 > 512	-95	30
N-EtFOSA	C ₁₀ H ₆ F ₁₇ NO ₂ S	526 > 169	-100	30
		526 > 526	-100	30
[¹⁸ O ₂]-PFHxS	C ₆ F ₁₃ S ¹⁸ O ₂ ¹⁶ O ⁻	403 > 103	-105	30
		403 > 403	-105	35
[¹³ C ₄]-PFOS	¹³ C ₄ ¹² C ₄ F ₁₇ SO ₃ ⁻	503 > 80	-105	50
		503 > 503	-105	50
[¹³ C ₄]-PFOA	¹³ C ₄ ¹² C ₄ HF ₁₅ O ₂	417 > 372	-30	10
		417 > 417	-30	5
[¹³ C ₅]-PFNA	¹³ C ₅ ¹² C ₄ HF ₁₇ O ₂	468 > 423	-45	10
		468 > 468	-45	5
[¹³ C ₂]-PFDA	¹³ C ₂ ¹² C ₈ HF ₁₉ O ₂	515 > 470	-45	10
		515 > 515	-45	5
N-d ₃ -MeFOSA	C ₉ D ₃ HF ₁₇ NO ₂ S	515 > 169	-100	30
		515 > 515	-100	30
N-d ₅ -EtFOSA	C ₁₀ D ₅ HF ₁₇ NO ₂ S	531 > 169	-100	30
		531 > 531	-100	30

Debido a la ausencia de materiales de referencia certificados para los analitos y matriz de interés en el momento de los experimentos, para validar la metodología analítica desarrollada se emplearon cuatro blancos constituidos por 1 g de tierra silíceo extrapura (suministrada por Scharlau, Barcelona, España) y cuatro réplicas de 1 g de un lodo (Lodo D) procedente de un Ejercicio Internacional de Intercalibración para el análisis de otros compuestos relacionados (*12th Round of the International Intercalibration Study*, organizado por el Prof. Bert van Bavel, *Chairman Workgroup International Intercalibration Studies*, Örebro University), a los que se le añadieron cantidades conocidas de los trece compuestos de interés. El Lodo D fue empleado como material de referencia aunque su contenido en PFAS no ha sido certificado todavía. Por ello, antes de su utilización, se caracterizó la presencia de PFAS en el mismo, detectándose sólo PFOA ($0,79 \pm 0,11$ ng/g m.s.; media \pm desviación estándar, SD) y PFDA ($0,44 \pm 0,47$ ng/g m.s.; media \pm SD), valores que se tuvieron en cuenta tanto en la adición de los compuestos nativos, como en el cálculo de las concentraciones y recuperaciones finales. A continuación, los blancos y las réplicas de Lodo D se sometieron a los procesos de extracción, purificación y análisis desarrollados (ver **Tabla 3.3.**). La bondad y exactitud de la metodología se estimaron mediante las recuperaciones obtenidas de los trece compuestos (compuestos nativos o no marcados: PFBS, PFHxS, PFOS, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, FOSA, *N*-MeFOSA y *N*-EtFOSA) añadidos previamente al proceso de extracción, considerando el valor teórico de su concentración, y las recuperaciones de los compuestos marcados ($^{18}\text{O}_2$ -PFHxS, $^{13}\text{C}_4$ -PFOS, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDA, *N*-d₃-MeFOSA y *N*-d₅-EtFOSA) utilizados como patrones internos añadidos también antes de la extracción. Los blancos constituidos por tierra silíceo presentaron recuperaciones de los compuestos nativos superiores al 80 % en la mayoría de los casos, concretamente en el intervalo de 69 a 141 % y para los compuestos marcados se obtuvieron recuperaciones superiores al 70 %. En caso del Lodo D, las recuperaciones de los compuestos nativos se encontraron en el intervalo de 64 % a 129 %, y para los compuestos marcados las recuperaciones fueron superiores al 60 % en la mayoría de los casos.

Las recuperaciones obtenidas para *N*-d₃-MeFOSA y *N*-d₅-EtFOSA fueron relativamente bajas en comparación con el resto de los compuestos marcados: 28 y 24 %, respectivamente, en el caso de los blancos de tierra silíceo y 46 y 42 %, respectivamente, en el caso de las réplicas de Lodo D. El compuesto utilizado para el cálculo de las

recuperaciones de los compuestos marcados ($^{13}\text{C}_5$ -PFNA) es un perfluoroalquil carboxilato, mientras que *N*-d₃-MeFOSA y *N*-d₅-EtFOSA son perfluorooctano sulfonamidas. La diferente naturaleza de estos compuestos podría provocar que se comportaran de distinto modo durante el análisis, lo que podría explicar los bajos resultados obtenidos.

La aplicación de la metodología desarrollada se llevó a cabo con veinte muestras de lodo procedentes de estaciones de depuración de aguas residuales distribuidas por toda la geografía nacional. Las diferentes instalaciones, y por tanto las correspondientes muestras, se clasificaron en tres grupos dependiendo del número de habitantes asociados a cada planta: L (área poco poblada: < 500.000 habitantes), M (área medianamente poblada: 500.000 - 1.000.000 habitantes) y H (área muy poblada: >1.000.000 habitantes).

Las muestras de lodo (1 g), a las que se añadieron los patrones de extracción correspondientes, fueron extraídas mediante una combinación de agitación, ultrasonificación y centrifugación. La purificación del extracto mediante SPE con cartuchos de carbón grafitizado y Oasis WAX permitió eliminar las interferencias y pre-concentrar la muestra para mejorar la determinación de los analitos de interés. Las condiciones experimentales utilizadas en este estudio se detallan en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Condiciones de extracción, purificación y análisis instrumental para la determinación de PFAS en lodo.

Extracción	Purificación	Análisis Instrumental	Cuantificación
Matriz: Lodo			
1 g muestra	<i>EnviCarb (500 mg, 6ml)</i>	HPLC-MS/MS	<i>Patrón de extracción</i>
Metanol (10 ml)	Acondicionamiento: metanol (5 ml)	Varian 212 LC-320 MS	¹⁸ O ₂ -PFH _x S
Agitación (10 min)	Lavado: metanol (1 ml)	<i>Fase móvil:</i>	¹³ C ₄ -PFOS
Ultrasonificación (30 min; 40 °C)	Dilución en 1 L agua Milli-Q	A) 2 mM acetato amónico	¹³ C ₄ -PFOA
Centrifugación (15 min; 3000 rpm)	<i>Oasis WAX (500 mg, 6 ml)</i>	B) Metanol	¹³ C ₂ -PFDA
Repetición ultrasonificación y centrifugación	Acondicionamiento:	Flujo: 200 µl /min	<i>N</i> -d ₃ -MeFOSA
Repetición centrifugación	0,1 % hidróxido amónico en metanol (12 ml)	<i>Columna:</i>	<i>N</i> -d ₅ -EtFOSA
	Agua Milli-Q (12 ml)	Varian Polaris C18 A	<i>Patrón de inyección</i>
	Lavado: 25 mM acetato sódico (12 ml)	(50 mm x 2,0 mm; 3 µm)	¹³ C ₅ -PFNA
	Elución: 0,1 % hidróxido amónico en metanol (8 ml)	T ^a horno: 40 °C	
		<i>Fuente:</i> ESI (-)	
		T ^a gas secado: 270 °C	
		Presión gas secado: 25 psi	
		Presión gas nebulización: 55 psi	
		T ^a cámara de ionización: 55 °C	
		<i>Shield:</i> - 450 V	
		Aguja de ionización: - 2000 V	
		Presión gas colisión: 1,8 mTorr	

Los disolventes y reactivos utilizados fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España).

Mientras que PFHxS, PFOS, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA y PFDA se detectaron en la mayoría de las muestras analizadas, PFBS, PFBA, FOSA, *N*-MeFOSA y *N*-EtFOSA no se detectaron en ninguna muestra. PFOA y PFDA se encontraron en el 95 % de las muestras, seguidas de PFOS en el 60 %, PFPeA y PFNA en el 40 %, PFHxA en el 20 % y PFHxS y PFHpA en el 15 %. Las concentraciones (ng/g m.s.) obtenidas se detallan en la **Tabla 3.4**. Los límites de detección variaron dependiendo del compuesto y la muestra considerada. Esta variabilidad podría explicarse por la diferente naturaleza y origen de los lodos evaluados.

En los blancos instrumentales analizados no se detectó ningún compuesto, sin embargo, PFOA, PFNA y PFDA se encontraron en varias muestras blanco procesadas simultáneamente con las muestras de lodo, en todos los casos con niveles por debajo del límite de cuantificación.

Las recuperaciones obtenidas (calculadas mediante la adición del patrón de recuperación $^{13}\text{C}_5$ -PFNA) fueron satisfactorias para la mayoría de los compuestos: $^{18}\text{O}_2$ -PFHxS (63 % \pm 13 %; media \pm SD), $^{13}\text{C}_4$ -PFOS (71 % \pm 13 %; media \pm SD), $^{13}\text{C}_4$ -PFOA (62 % \pm 8 %; media \pm SD), $^{13}\text{C}_2$ -PFDA (52 % \pm 7 %; media \pm SD), *N*-d₃-MeFOSA (61 % \pm 18 %; media \pm SD) y *N*-d₅-EtFOSA (68 % \pm 25 %; media \pm SD).

Tabla 3.4. Concentración de PFAS (ng/g m.s.) en lodos de EDAR.

	PFHxS	PFOS	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA
L1	< 0,03	30,0	< 0,15	< 0,13	< 0,07	1,35	< 0,08	3,34
L2	< 0,14	43,5	1,81	< 0,04	< 0,03	1,33	< 0,26	0,34
L3	< 0,02	< 0,40	2,66	1,31	< 0,02	5,43	< 0,02	1,28
L4	18,2	95,8	3,36	< 0,10	< 0,10	2,85	< 0,02	2,44
L5	< 0,02	32,7	< 0,45	2,60	2,04	7,94	10,2	21,5
L6	< 0,02	144	2,92	< 0,05	< 0,13	2,20	< 0,01	2,93
L7	< 0,05	24,7	< 0,14	1,54	< 0,01	4,63	< 0,18	6,23
L8	< 0,02	< 0,84	2,45	< 0,19	0,87	3,05	< 0,01	4,72
L9	< 0,01	26,5	< 0,15	< 0,05	< 0,26	1,58	3,01	24,3
L10	< 0,01	77,6	< 0,26	< 0,07	< 0,08	2,13	< 0,16	4,59
L11	< 0,03	< 0,03	< 0,36	< 0,30	< 0,18	5,90	1,18	5,55
L12	7,09	< 0,03	< 0,44	< 0,15	< 0,30	0,92	< 0,01	7,22
M1	< 0,01	249	< 0,18	< 0,04	< 0,05	4,18	2,13	1,98
M2	< 0,01	< 0,02	2,58	1,16	< 0,05	1,54	< 0,02	1,14
M3	< 0,04	287	< 0,35	< 0,23	< 0,08	2,94	4,06	14,0
M4	< 0,02	< 0,01	4,69	< 0,10	0,96	< 0,03	< 0,04	< 0,04
M5	< 0,02	< 0,02	< 0,22	< 0,03	< 0,05	1,87	1,10	2,02
M6	< 0,01	< 0,11	2,07	< 0,07	< 0,01	1,04	1,01	0,80
H1	3,48	209	< 0,08	< 0,12	< 0,28	4,98	< 0,15	2,85
H2	< 0,01	58,6	< 0,05	< 0,03	< 0,08	1,04	1,00	1,00
Intervalo	< 0,01 - 18,2	< 0,01 - 287	< 0,05 - 4,69	< 0,03 - 2,60	< 0,01 - 2,04	< 0,03 - 7,94	< 0,01 - 10,2	< 0,04 - 24,3
Media	1,46	64,0	1,27	0,42	0,28	2,85	1,23	5,41
SD	4,30	89,1	1,14	0,69	0,49	2,04	2,40	6,78
LOD	0,01 - 0,29	0,01 - 1,02	0,05 - 1,81	0,03 - 0,67	0,01 - 0,70	0,03 - 0,33	0,01 - 0,26	0,01 - 0,60

< x: por debajo del límite de detección.

PFBS, PFBA, FOSA, N-MeFOSA y N-EtFOSA no se detectaron en ninguna muestra.

La contribución individual de cada PFAS en las muestras evaluadas se detalla en la **Figura 3.1**. La variabilidad observada en la composición relativa de PFAS en los lodos podría deberse a las distintas características de las instalaciones estudiadas así como a los diferentes procesos de tratamiento a los que han sido sometido los lodos. PFOS es el compuesto con mayor concentración (287 ng/g m.s.), siendo su contribución a la concentración total de PFAS claramente significativa en comparación con PFOA (0,92 - 7,94 ng/g m.s) y PFDA (0,34 - 24,3 ng/g m.s.). Este comportamiento predominante de PFOS ha sido previamente descrito en lodos procedentes de diferentes localizaciones (Higgins y col., 2005; Schultz y col., 2006; Loganathan y col., 2007; D'eon y col., 2009; Petersen y col., 2009; de Boer y col., 2010; Ruowei y Kaimin, 2010), sin embargo, la dominancia de PFOA sobre PFOS también ha sido observada en algunos casos (Sinclair y Kannan, 2006a; Loganathan y col., 2007), ver **Tabla 3.5**.

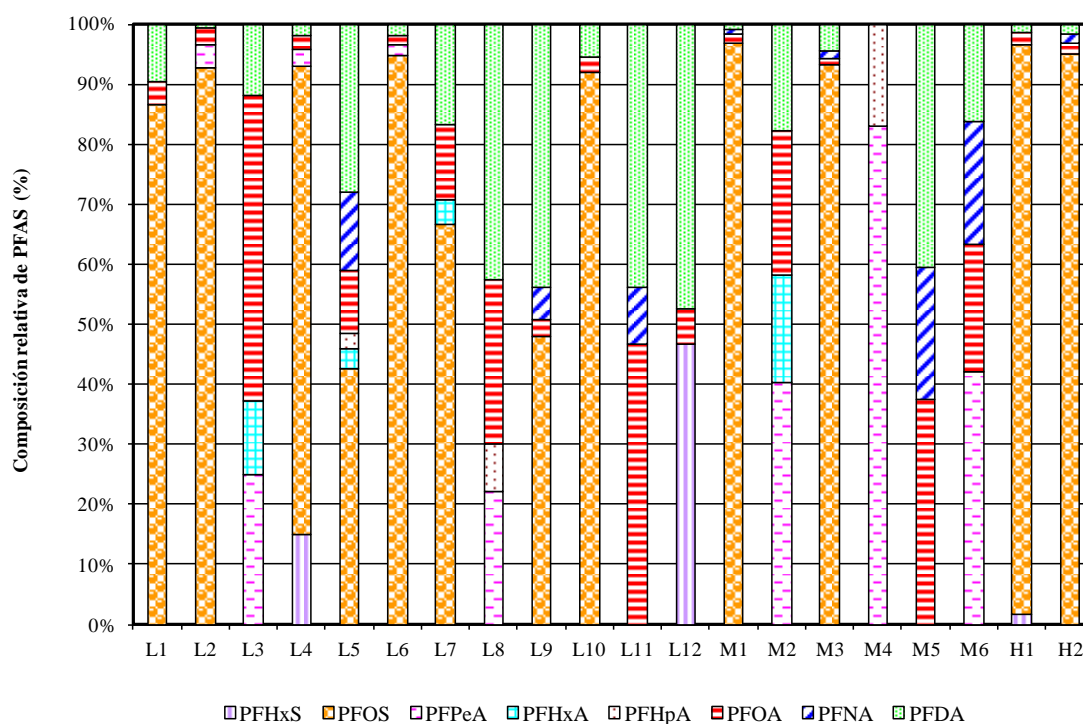


Figura 3.1. Contribución individual de PFAS (%) en las muestras de lodos de EDAR estudiadas.

Tabla 3.5. Comparación de resultados de PFOS y PFOA en lodos en diferentes estudios.

Muestra	Localización	Año	PFOS (ng/g)	PFOA (ng/g)	Referencia
Lodo	USA	1998 - 2004	14,4 - 2610	< 6 - 29,4	Higgins y col., 2005
Lodo	Ontario	2002	0,07 - 460	0,11 - 4,5	D'eon y col., 2009
Lodo	Noroeste del Pacífico	2004	42 - 100	< 3 - 7,1	Schultz y col., 2006
Lodo	Estado de Nueva York	2005	< 10 - 65	18 - 241	Sinclair y Kannan, 2006
Lodo	Kentucky	2005	8,2 - 993	8,3 - 219	Loganathan y col., 2007
Lodo	Georgia	2005	< 2,5 - 77	7,0 - 130	Loganathan y col., 2007
Lodo	Hong Kong	2008	3,1 - 7305	1,3 - 15,7	Ruowei y Kaimin, 2010
Lodo	Alemania	2009	< 1,0 - 1910	< 1,0 - 405	Petersen y col., 2009
Lodo	Países Bajos	2009	35,4 - 47,7	N.D.	de Boer y col., 2010
Lodo	España	2006	< 0,01 - 287	< 0,03 - 7,94	Navarro y col., 2011

Los niveles totales de perfluoroalquil carboxilatos (Σ PFCA) encontrados en las muestras de lodo fueron consistentemente inferiores a los obtenidos para perfluoroalquil sulfonatos (Σ PFSA). Considerando el nivel límite de 100 $\mu\text{g/kg}$ m.s. para la suma de PFOS y PFOA establecido en Alemania para lodos procedentes de aguas residuales utilizados en agricultura (Grümping y col., 2007), el 20 % de las muestras de lodo estudiadas excedieron este valor límite significativamente, principalmente debido a la contribución de PFOS.

Consecuentemente, el presente estudio ha proporcionado un método analítico efectivo para determinar en una única inyección trece sustancias perfluoradas a nivel traza (siete perfluoroalquil carboxilatos, tres perfluoroalquil sulfonatos y tres perfluorooctano sulfonamidas) en lodos de EDAR. Además, mediante este estudio se ha demostrado la presencia de PFAS en lodos procedentes de EDAR distribuidas por toda la geografía nacional.

3.2. Transferencia de sustancias perfluoradas desde suelo enmendado a aguas de lixiviación y escorrentía

Artículo II:

“Transfer of PFOS, BDE-209 and DP from biosolid amended soils to leachate and runoff water”.

Irene Navarro, Adrián de la Torre, Paloma Sanz, Miguel Ángel Porcel, Gregoria Carbonell, María de los Ángeles Martínez.

Enviado para su publicación.

Los biosólidos son ricos en nitrógeno, fósforo y otros elementos traza, así como en materia orgánica, hecho que les convierte en una fuente adecuada de nutrientes y en un buen fertilizante para mejorar las propiedades físicas del suelo (Kinney y col., 2006; Perkola y col., 2013). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los biosólidos de EDAR aunque no procedan de zonas con fuentes específicamente relacionadas con la industria de perfluoroquímicos también contienen PFAS en concentraciones traza (Clarke y Smith, 2011; Navarro y col., 2011). Esto mismo se ha observado para otros compuestos orgánicos halogenados, como son los retardantes de llama (HFR, por sus siglas en inglés, *Halogenated Flame Retardants*) (Clarke y Smith, 2011; de la Torre y col., 2011a, 2011b). La movilización de estos compuestos desde los biosólidos o el suelo que los contiene hacia el sistema acuático podría ser un riesgo de contaminación. La precipitación natural podría disolver los compuestos solubles o podría arrastrar la materia particulada suspendida procedente de los biosólidos o del suelo. De hecho, el agua superficial es el principal compartimento medioambiental en el que las PFAS se acumulan y es considerada una de las rutas de transporte más importantes para su propagación y distribución global en el medio ambiente (Prevedouros y col., 2006). De modo que estos contaminantes podrían ser transportados por el agua de lluvia a través del suelo y alcanzar otros compartimentos medioambientales como son el agua subterránea y/o el agua superficial y, de esta forma, contribuir a la exposición de los seres vivos y el hombre.

En el presente estudio, se diseñó un ensayo de semicampo con el objeto de simular las condiciones naturales y determinar la capacidad de lixiviación y escorrentía de algunos contaminantes emergentes como consecuencia de la aplicación de residuo orgánico en la agricultura. Además de PFOS, se analizaron también algunos retardantes de llama halogenados como son el decabromodifenil éter, BDE-209, y el declorané plus, DP. Los resultados correspondientes a estos dos compuestos no se exponen en la discusión de esta memoria por encontrarse fuera del alcance de esta Tesis.

Primeramente, se caracterizó el contenido de PFAS en dieciséis biosólidos (Navarro y col., 2016) y tras evaluar detenidamente su composición, se seleccionaron cuatro de ellos para el ensayo de semicampo: un compost de RSU digerido aeróbicamente (W-1), un lodo secado térmicamente digerido anaeróbicamente (W-2), un lodo compostado digerido aeróbicamente (W-3) y un compost de RSU digerido anaeróbicamente (W-4). Los detalles de esta caracterización se han presentado en el apartado 3.3 de esta Tesis. Una vez seleccionados, para comprobar el destino del PFOS en el sistema suelo-agua, estos cuatro biosólidos fueron fortificados mediante la adición de ~1 mg PFOS/kg biosólido.

El estudio de semicampo se llevó a cabo en quince mesas (de 2,5 m de longitud y 2,0 m de anchura), que contenían 5 cm de capa de suelo (tamizado a 6 mm) soportado por un marco metálico con una pendiente del 10 % (**Figura 3.2.**). El suelo utilizado como referencia es un suelo de la Finca de La Canaleja (Alcalá de Henares), que por sus características es considerado un suelo típico de la zona continental española, con escaso aporte de materia orgánica y por lo tanto idóneo para soportar enmiendas agrícolas procedentes de residuos orgánicos. Este suelo no ha sido abonado con enmiendas orgánicas ni ha sufrido tratamientos con productos fitosanitarios al menos en los últimos 10 años. A cada mesa se conectaron dos sistemas individuales para recoger independientemente el agua de los lixiviados y el de escorrentía. Los biosólidos fortificados se aplicaron en la parte superior de las mesas (en una franja de 0,5 m de longitud y 2,0 m de anchura). El sistema no fue irrigado artificialmente, solo recibía el agua de lluvia, y por su diseño, el agua podía moverse vertical y lateralmente simulando un sistema natural. Las muestras de agua de lixiviación y escorrentía se recogieron en varios eventos de lluvia entre los años 2011 y 2012, y posteriormente, después de finalizar estos, se recogieron dos muestras compuestas de suelo de cada una de las mesas:

una se obtuvo de la parte superior de la mesa (en los 0,5 m primeros de longitud, donde se añadieron los biosólidos fortificados) y la otra muestra del resto de la superficie (**Figura 3.3.**). Los cuatro tratamientos y el control se realizaron en triplicado (tres mesas por tratamiento) y el análisis se llevó a cabo con muestras procedentes de la combinación de las tres mesas. La metodología analítica utilizada para la determinación de PFAS en las distintas matrices evaluadas se detalla en la **Tabla 3.6.**

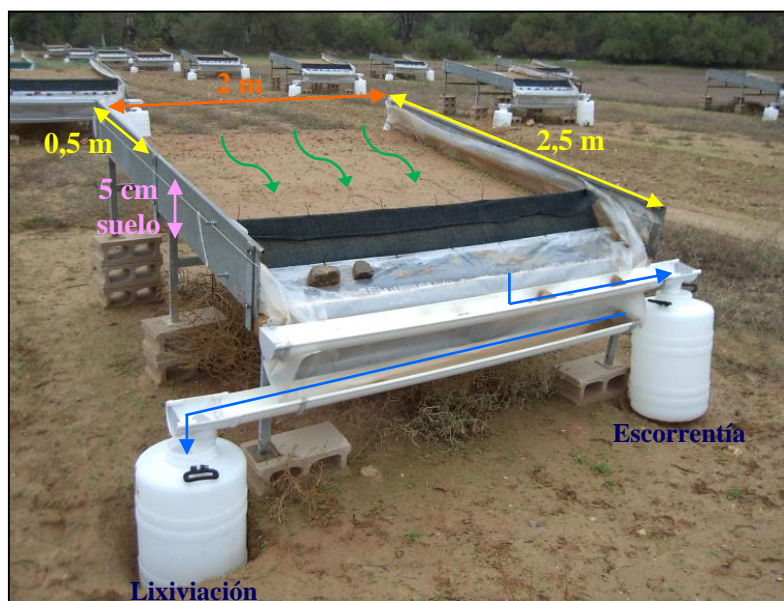


Figura 3.2. Sistema utilizado en el estudio de semicampo para determinar la capacidad de lixiviación y escorrentía de PFOS. Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología, INIA, 2011.



Figura 3.3. Detalle de una mesa del estudio de semicampo después de tomar las muestras de suelo. Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología, INIA, 2012.

Tabla 3.6. Condiciones de extracción, purificación y análisis instrumental para la determinación de PFAS en biosólidos, suelo y agua de lixiviación o escorrentía.

Extracción	Purificación	Análisis Instrumental	Cuantificación
Matriz: Agua de lixiviación o escorrentía			
2 L muestra	EnviCarb (500 mg, 6ml)	HPLC-MS/MS	Patrón de extracción
Oasis WAX (500 mg, 6 ml)	Acondicionamiento: metanol (5 ml)	Varian 212 LC-320 MS	MPFAC-MXA
Acondicionamiento:	Lavado: metanol (1 ml)	Fase móvil:	N-d ₃ -MeFOSA
0,1 % hidróxido amónico en metanol (12 ml)		A) 2 mM acetato amónico	N-d ₅ -EtFOSA
Agua Milli-Q (12 ml)		B) Metanol	Patrón de inyección
Lavado: 25 mM acetato sódico (12 ml)		Flujo: 200 µl /min	¹³ C ₉ -PFNA
Elución: 0,1 % hidróxido amónico en metanol (8 ml)		Columna:	
		ACE C18-PFP	
		(50 mm x 2,1 mm; 3 µm)	
		Tª horno: 40 °C	
		Fuente: condiciones Tabla 3.3.	
Matriz: Biosólido y suelo			
Biosólido: 1 g muestra	Condiciones descritas en Tabla 3.3.	Condiciones descritas para agua de lixiviación o escorrentía	Patrón de extracción
Suelo: 5 g muestra			MPFAC-MXA
Condiciones descritas en Tabla 3.3.			N-d ₃ -MeFOSA
			N-d ₅ -EtFOSA
			Patrón de inyección
			¹³ C ₉ -PFNA

Las concentraciones de PFAS en los biosólidos fortificados se detallan en la **Tabla 3.7**. Los niveles de PFOS se encontraron en el intervalo de 301 y 1070 ng/g m.s., correspondiendo al 60 ± 35 % (media \pm SD) de la concentración teórica añadida. PFOS fue el compuesto predominante (92 ± 2 %; media \pm SD), pero compuestos de cadena más corta como PFHxS (4 ± 1 %; media \pm SD) y PFBS ($0,6 \pm 0,9$ %; media \pm SD) también fueron detectados.

Tabla 3.7. Concentración (ng/g m.s.) de PFAS en los cuatro biosólidos fortificados.

	B-1	B-2	B-3	B-4
PFBS	N.D.	N.D.	21,6	2,94
PFHxS	14,6	34,9	38,0	18,8
PFOS	301	672	1070	374
PFPeA	N.D.	6,64	N.D.	N.D.
PFHxA	N.D.	10,3	N.D.	N.D.
PFHpA	N.D.	N.D.	N.D.	2,93
PFOA	5,63	8,19	11,5	3,15
PFNA	N.D.	1,38	N.D.	0,51
PFDA	N.D.	12,1	10,2	1,04
PFUdA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFDoA	N.D.	1,40	N.D.	N.D.
Σ PFAS	321	746	1151	403

B-1, B-2, B-3 y B-4 son los biosólidos fortificados correspondientes a los biosólidos seleccionados W-1, W-2, W-3 y W-4, respectivamente.

N.D.: no detectado.

PFDS, PFBA, PFTTrDA, PFTeDA, PFHxDA, PFODA, FOSA, N-MeFOSA y N-EtFOSA no se detectaron en ninguna muestra.

La presencia de PFAS en el suelo al principio (t=0 días) y al final (t=293 días) del ensayo de semicampo se encuentra detallada en la **Tabla 3.8**. La concentración de PFOS (t=0) en la parte superior de la mesa (< 0,5 m), donde se aplicaron los biosólidos fortificados, fue 0,11 ng/g m.s en el suelo control o de referencia y de 38,0 a 94,3 ng/g

m.s. en los suelos enmendados. PFBS, PFHxS, PFOA y PFDA se detectaron frecuentemente en los suelos pero en proporciones más bajas que PFOS. Las concentraciones de PFAS en suelos correlacionaron linealmente con las concentraciones en los biosólidos ($r = 0,827$; $p < 0,01$; test de Spearman). Aunque los biosólidos aplicados fueron fortificados con PFOS, los niveles obtenidos en los suelos están en concordancia con concentraciones de suelos enmendados con biosólidos detectadas en otros estudios: Sepulvado y col. (2011) detectaron PFOS en suelos enmendados con biosólidos en el intervalo de concentración entre 5,5 y 483 ng/g m.s. y Washington y col. (2010) encontraron concentraciones desde 0,6 a 408 ng/g m.s. No obstante, niveles más bajos han sido también detectados en suelos enmendados con biosólidos (1,21 - 28,5 ng/g m.s.; Wen y col., 2015). PFOS fue el compuesto predominante ($97 \pm 0,5$ %; media \pm SD) seguido de PFHxS ($2 \pm 0,4$ %; media \pm SD). La relación entre la concentración en los suelos enmendados con biosólidos y el suelo control, al principio del experimento, fue calculada para evaluar la contribución de la aplicación del biosólido al suelo. El valor medio de esta relación obtenido para PFOS fue 498 ± 241 (media \pm SD), mostrando un importante incremento en la concentración del suelo debido a la enmienda. Teniendo en cuenta la fortificación de los biosólidos con PFOS, este valor podría simular el efecto acumulativo de repetidas aplicaciones de biosólidos en condiciones de campo. Los valores para PFBS, PFHxS, PFOA y PFDA no se pudieron calcular ya que estos compuestos no se detectaron en el suelo control, sin embargo su presencia en los suelos enmendados se podría explicar por la contribución debida a la aplicación de los biosólidos.

Las sustancias perfluoradas se detectaron en las aguas de lixiviación y escurrentía recogidas después de tres eventos de lluvia y sus concentraciones correlacionaron linealmente con las concentraciones de suelo ($r = 0,590$; $p < 0,01$; test de Spearman). Los niveles de PFOS en el agua de escurrentía (136 ng/L; media) fueron significativamente superiores ($p < 0,05$; test de U Mann-Whitney) a los detectados en agua de lixiviación (11,6 ng/L) en los cuatro tratamientos y en todos los eventos de lluvia. En la **Figura 3.4.** se puede ver la concentración de PFOS obtenida en los distintos eventos de lluvia para los cuatro tratamientos considerados. Además, se observa un notable descenso de concentración del primer al tercer evento de lluvia, indicando que el agua de lluvia podría movilizar este compuesto soluble a través del suelo. Por ello, se calculó la cantidad de PFOS retirada del suelo a través del agua de lixiviación y escurrentía, y se observó una

disminución de concentración PFOS en las mesas de suelo debida al agua de esorrentía ($0,11 \pm 0,02$ %; media \pm SD) superior a la pérdida debida al agua de lixiviación ($0,06 \pm 0,03$ %; media \pm SD). Estos resultados son corroborados por la distribución de PFOS en los dos tipos de agua, reflejándose un mayor contenido en el agua de esorrentía (91 ± 2 %; media \pm SD).

Tabla 3.8. Concentración de PFAS (ng/g m.s.) en el suelo al principio (t=0 días) y al final (t=293 días) del ensayo de semicampo.

	CONTROL			T-1			T-2			T-3			T-4		
	t=0	t=final		t=0	t=final		t=0	t=final		t=0	t=final		t=0	t=final	
	<0,5 m	<0,5 m	0,5-2,5 m	<0,5 m	<0,5 m	0,5-2,5 m	<0,5 m	<0,5 m	0,5-2,5 m	<0,5 m	<0,5 m	0,5-2,5 m	<0,5 m	<0,5 m	0,5-2,5 m
PFBS	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,35	0,20	N.D.
PFHxS	N.D.	N.D.	N.D.	0,97	2,70	N.D.	1,37	0,72	N.D.	0,82	0,27	N.D.	2,31	1,79	0,11
PFOS	0,11	0,16	0,29	41,8	84,7	0,59	45,0	36,1	0,41	38,0	30,1	0,33	94,3	47,2	0,49
PFHxA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,28	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFHpA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,36	N.D.
PFOA	N.D.	N.D.	N.D.	0,22	1,13	N.D.	0,15	4,54	0,16	0,27	0,36	0,06	0,33	0,43	N.D.
PFNA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,49	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFDA	N.D.	0,10	N.D.	N.D.	0,79	N.D.	0,40	2,56	0,13	0,27	0,42	0,09	0,15	0,29	N.D.
PFUdA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,14	N.D.	N.D.	0,34	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFDoA	N.D.	N.D.	N.D.	0,12	0,23	N.D.	N.D.	0,40	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Σ PFAS	0,11	0,26	0,29	43,1	89,6	0,59	46,8	46,5	0,70	39,3	31,1	0,48	97,5	50,3	0,60

N.D. : no detectado. <0,5 m= área superior de la mesa donde el biosólido fue aplicado; 0,5-2,5 m= área restante de la mesa sin enmienda.

PFDS, PFBA, PFPeA, PFTrDA, PFTeDA, PFHxDA, PFODA, FOSA, N-MeFOSA y N-EtFOSA no se detectaron en ninguna muestra.

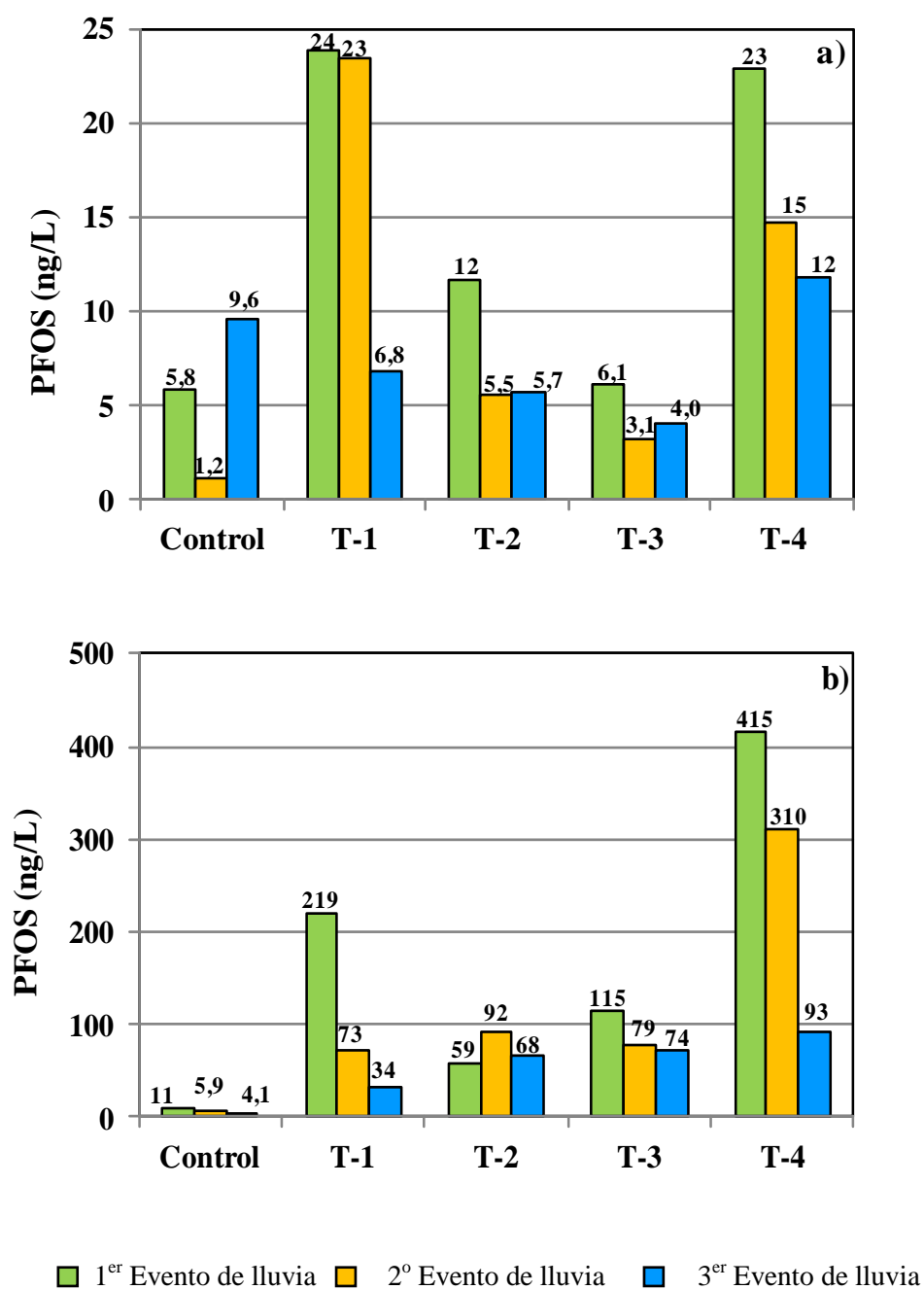


Figura 3.4. Concentración de PFOS (ng/L) en aguas de lixiviación (a) y escorrentía (b).

La distribución y destino de los compuestos químicos en varios compartimentos medioambientales están influenciados por sus propiedades físico-químicas. Así por ejemplo, el coeficiente de distribución octanol-agua (K_{ow}) ha sido considerado un factor determinante en el potencial de transporte de escorrentía de productos farmacéuticos y de cuidado personal (Sabourin y col., 2009). En dicho estudio, los compuestos con coeficientes de distribución más bajos mostraron un mayor potencial de transporte hacia el agua de escorrentía. Considerando el valor de $\log K_{ow}$ de PFOS (4,49), en comparación con otros compuestos orgánicos persistentes (como los polibromodifenil éteres, PBDE, con valores de $\log K_{ow}$ entre 5,88 y 12,1), se espera que tenga una alta movilidad o disponibilidad para ser transportado a través del agua. En paralelo, el coeficiente de distribución carbono orgánico-agua (K_{oc}) proporciona una buena estimación de la probabilidad de lixiviación a través del suelo. En general, los compuestos con un elevado valor de K_{oc} tienden a quedar adsorbidos más fuertemente al carbono orgánico, mientras que aquellos con valores más bajos de K_{oc} son más fácilmente lixiviados (Wilson y col., 1996). El valor de K_{oc} de PFOS (3,41; expresado como valor logarítmico) indica, por tanto, una mayor movilización debida a la lixiviación, en comparación con otros compuestos organohalogenados, como por ejemplo el BDE-209 (7,68) o el DP (9,78).

Además, otros dos coeficientes de distribución medioambientales, comúnmente utilizados para evaluar la tendencia de lixiviación de contaminantes orgánicos (Laskowski y col., 1982; Gustafson, 1989; Wilson y col., 1996; Papa y col., 2004) se han aplicado a PFOS. El primer modelo utilizado para evaluar el grado potencial de la contaminación de agua subterránea y agua de ríos es el potencial de lixiviación (L_p) definido por Laskowski y col. (1982), como:

$$L_p = \frac{S}{V_p \times K_{oc}}$$

donde S es la solubilidad en agua en mg/L a 25 °C, V_p es la presión de vapor en Pascales (Pa) a 25 °C y K_{oc} es el coeficiente de distribución entre el carbono orgánico y el agua en cm^3/g (Laskowski y col., 1982; Wilson y col., 1996). Los compuestos con mayor capacidad de lixiviación en el medioambiente presentan valores más altos de L_p . El valor obtenido para PFOS, $4,7 \times 10^{-5}$, refleja cierto potencial de lixiviación en comparación con otros compuestos organohalogenados estudiados en las mismas condiciones como

BDE-209 ($9,5 \times 10^{-10}$) y DP ($3,0 \times 10^{-11}$). Los valores de S, V_p y K_{oc} utilizados se estimaron mediante el modelo matemático EPISuite 4.1.

El segundo modelo empleado en este estudio establece dos potenciales de lixiviación basados en las propiedades de adsorción y persistencia de los compuestos en el suelo, distinguiendo entre compuestos capaces de ser lixiviados y compuestos que no lo son. Este potencial de lixiviación viene definido por el índice de ubicuidad en el agua subterránea (“*Groundwater Ubiquity Score*”, GUS, por sus siglas en inglés) (Gustafson, 1989; Wilson y col., 1996; Papa y col., 2004).

$$GUS = \log_{10} T_{1/2} \times (4 - \log_{10} K_{oc})$$

donde $T_{1/2}$ es la vida media en suelo en días y K_{oc} es el coeficiente de distribución entre el carbono orgánico y el agua en cm^3/g . Valores de GUS superiores a 2,8 se asocian a compuestos capaces de ser lixiviados, con un alto riesgo de contaminación, valores entre 1,8 y 2,8 corresponden a compuestos de movilidad intermedia y valores inferiores a 1,8 a compuestos que no son lixiviados. El valor calculado para PFOS fue 2,0 que correspondería con un compuesto de movilidad intermedia. Para corroborar esto, se calcularon el coeficiente de distribución de adsorción sólido-líquido (K_d) y el coeficiente de distribución entre el carbono orgánico y el agua (K_{oc}), basados en condiciones de campo. K_d se calculó mediante la relación entre la concentración del compuesto en suelo (ng/kg) y la concentración en agua de lixiviación y esorrentía (ng/L) (Zareitalabad y col., 2013). K_{oc} se calculó considerando K_d y la fracción de carbono orgánico del suelo (F_{oc}) como se indica (Labadie y Chevreuil, 2011):

$$K_{oc} = K_d \times \frac{100}{F_{oc}}$$

El valor de K_{oc} calculado con los datos del ensayo de semicampo para PFOS fue $4,59 \pm 0,61$ (expresado como $\log K_{oc}$; media \pm SD). Este valor es superior al valor teórico calculado con EPISuite (3,41) y superior a los valores de $\log K_{oc}$ experimentales obtenidos en suelos (2,9; Milinovic y col., 2015), suelos y sedimentos ($3,0 \pm 0,7$; media \pm SD, Zareitalabad y col., 2013) y lodos de EDAR (2,6 - 2,9; Milinovic y col., 2016). Sin embargo, los valores obtenidos con nuestros datos son muy similares a valores obtenidos en condiciones de campo: 4,2 (Zareitalabad y col., 2013) y $3,7 \pm 0,2$ (media \pm SD, Labadie y Chevreuil, 2011) para sedimentos, 4,3 para lodos de EDAR (Zareitalabad y

col., 2013) y $4,8 \pm 0,1$ (media \pm SD) para materia particulada suspendida (Ahrens y col., 2010).

Por último, se puede concluir que la presencia de sustancias perfluoradas en biosólidos, suelos enmendados con biosólidos y aguas de lixiviación y escorrentía demuestra la movilidad y transferencia de estos contaminantes emergentes a diferentes compartimentos medioambientales como consecuencia de la aplicación de biosólidos en suelos agrícolas. Se ha observado un elevado potencial de movilidad de PFOS a través del suelo mediante aguas de lixiviación y escorrentía. Los superiores niveles de PFOS encontrados en el agua de escorrentía en comparación con los detectados en el agua de lixiviación, parecen indicar que los fenómenos de transporte por escorrentía podrían constituir la ruta de transferencia preferencial de este contaminante a través de los diferentes compartimentos medioambientales.

3.3. Transferencia de sustancias perfluoradas desde suelo enmendado a organismos invertebrados del suelo

Artículo III:

“Bioaccumulation of emerging organic compounds (perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants) by earthworms in biosolid amended soils”.

Irene Navarro, Adrián de la Torre, Paloma Sanz, Javier Pro, Gregoria Carbonell, María de los Ángeles Martínez.

Environmental Research (2016) 149: 32-39.

Los seres vivos pueden alcanzar altas concentraciones de ciertos contaminantes orgánicos presentes en el medio ambiente en el que habitan. En ecosistemas terrestres, las lombrices de tierra son un nexo de transporte de contaminantes medioambientales desde el suelo a otros organismos (Sellström y col., 2005). Además, constituyen un apropiado organismo modelo para evaluar la biodisponibilidad de los contaminantes, puesto que habitan en contacto directo con el suelo, poseen una delgada y permeable cutícula y consumen grandes cantidades de suelo (Jager y col., 2005).

En el presente estudio, se utilizaron sistemas de suelo multiespecie (MS·3) para evaluar en organismos del suelo los efectos asociados a la aplicación de biosólidos como enmienda agrícola. El sistema MS·3 es un microcosmos terrestre, constituido por microorganismos, organismos invertebrados y plantas incorporados en columnas de suelo natural, que permite simular las condiciones de un suelo agrícola (Fernández y col., 2004; Carbonell y col., 2009). En este sistema, la interfase suelo-aire, el transporte del agua y la cinética de degradación/absorción se reproducen de un modo más efectivo que en un bioensayo estándar de suelo (Boleas y col., 2005).

El principal objetivo de este trabajo fue determinar la transferencia y bioacumulación de los compuestos orgánicos emergentes seleccionados desde suelos enmendados con biosólidos a lombrices de tierra (*Eisenia andrei*) utilizando sistemas MS·3. Además de sustancias perfluoradas, se estudiaron retardantes de llama

halogenados, cuyos resultados no se exponen en la discusión de esta memoria por encontrarse fuera del alcance de esta Tesis.

Primeramente, se realizó una caracterización de las sustancias perfluoradas presentes en dieciséis biosólidos: cuatro compost de RSU y doce biosólidos procedentes de EDAR (siete lodos de EDAR compostados y cinco lodos de EDAR secados térmicamente). PFDA se detectó en el 88 % de las muestras, PFOA en el 75 % y PFOS en el 63 %. La sustancia perfluorada con mayor contribución fue PFOS, cuyo intervalo de concentración en las muestras evaluadas se encontró entre 3,95 y 83,5 ng/g m.s., seguido de PFHxA, con concentraciones entre 4,65 y 32,2 ng/g m.s., PFOA, con concentraciones entre 0,99 y 14,0 ng/g m.s. y PFDA, con concentraciones entre 0,54 y 18,3 ng/g m.s.

De los dieciséis biosólidos analizados, se seleccionaron cuatro para llevar a cabo el ensayo de MS·3: un compost de residuo sólido urbano digerido aeróbicamente (W-1), un lodo secado térmicamente digerido anaeróbicamente (W-2), un lodo compostado digerido aeróbicamente (W-3) y un compost de RSU digerido anaeróbicamente (W-4). Las concentraciones de las sustancias perfluoradas detectadas en estos biosólidos se detallan en la **Tabla 3.9**. PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA y PFUdA mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Student) entre los biosólidos seleccionados, lo que podría resultar de interés para evaluar el comportamiento de estos compuestos en el ensayo de MS·3. El intervalo de concentración de PFAS en los biosólidos seleccionados se encontró entre 0,21 y 64,4 ng/g m.s., observándose valores superiores en los lodos de EDAR (W-2 y W-3) que en los compost de RSU (W-1 y W-4). El biosólido W-2 presentó el mayor contenido total de PFAS (Σ PFAS: 120 ng/g m.s.) seguido de W-3 (96,8 ng/g m.s.), W-1 (27,3 ng/g m.s.) y W-4 (17,6 ng/g m.s.). PFOS (37 %), PFBA (31 %), PFOA (11 %) y PFDA (10 %) fueron los compuestos con mayor contribución al contenido total de PFAS en estos cuatro biosólidos.

Tabla 3.9. Concentración de PFAS (ng/g m.s.) en los cuatro biosólidos seleccionados.

	W-1	W-2	W-3	W-4
PFBS	N.D.	N.D.	N.D.	2,05 ± 0,36
PFOS	14,6 ± 5,25	28,2 ± 2,19	64,4 ± 7,87	0,65 ± 0,30
PFBA	N.D.	34,3 ± 10,2	N.D.	5,74 ± 0,89
PFPeA	2,03 ± 0,70	2,11 ± 0,11	3,35 ± 1,11	2,29 ± 0,41
PFHxA	0,92 ± 0,65	4,77 ± 0,37	5,34 ± 0,25	1,78 ± 0,32
PFHpA	0,64 ± 0,12	0,85 ± 0,14	1,44 ± 0,33	0,80 ± 0,04
PFOA	3,65 ± 0,35	8,90 ± 0,13	9,37 ± 0,19	2,52 ± 0,24
PFNA	0,55 ± 0,02	2,58 ± 1,03	1,25 ± 0,27	0,73 ± 0,21
PFDA	3,46 ± 0,67	19,0 ± 0,61	7,55 ± 0,62	0,64 ± 0,02
PFUdA	0,58 ± 0,05	2,57 ± 0,37	0,99 ± 0,17	0,17 ± 0,05
PFDoA	0,66 ± 0,12	2,20 ± 0,53	0,92 ± 0,37	0,17 ± 0,08
PFTTrDA	0,21 ± 0,08	1,22 ± 0,37	N.D.	N.D.
PFTeDA	N.D.	5,97 ± 3,90	2,20 ± 0,11	N.D.
PFHxDA	N.D.	4,74 ± 2,94	N.D.	N.D.
PFODA	N.D.	2,64 ± 1,89	N.D.	N.D.
Σ PFAS	27,3 ± 5,41	120 ± 15,9	96,8 ± 8,66	17,6 ± 1,11

Los datos representan la media ± desviación estándar (n=3).

N.D.: no detectado.

PFHxS, PFDS, FOSA, *N*-MeFOSA y *N*-EtFOSA no se detectaron en ninguna muestra.

A continuación, los cuatro biosólidos se aplicaron al suelo control o de referencia. El suelo empleado en este estudio fue un típico suelo agrícola con historia conocida, en el que pesticidas y fertilizantes no se habían aplicado al menos en los últimos 10 años. La tasa de aplicación del biosólido se calculó en base a los requerimientos agronómicos de nitrógeno necesarios para el crecimiento de las plantas, lo que limitó la cantidad de contaminantes añadidos al suelo.

Las concentraciones de PFAS en los suelos enmendados correlacionaron linealmente ($r = 0,597$; $p < 0,01$; test de Spearman) con las concentraciones encontradas

en los biosólidos. PFOS (25 %) fue el compuesto predominante seguido de PFBA y PFOA (22 %). La contribución de la aplicación de los biosólidos en el suelo fue evaluada calculando la relación entre las concentraciones de PFAS encontradas en los suelos enmendados y las concentraciones del suelo control. Los valores medios obtenidos fueron superiores a 1, lo que indica que se produjo un incremento en la concentración de PFAS en el suelo debido a la enmienda. Considerando los diferentes tratamientos llevados a cabo en el ensayo, el tratamiento 2 (T-2) presentó el mayor valor medio en la relación suelo enmendado/suelo control (5,20). Como se ha indicado anteriormente, el biosólido empleado en este tratamiento, un lodo secado térmicamente digerido anaeróbicamente (W-2), alcanzó la mayor concentración de PFAS seguida de W-3, W-1 y W-4. Esta tendencia observada en los biosólidos se encuentra en concordancia con la relación suelo enmendado/suelo control calculada: T-2 (5,20) > T-3 (3,79) > T-1 (1,99) > T-4 (1,61), lo que revela un comportamiento dependiente de la dosis aplicada.

Una vez que se caracterizaron las mezclas de suelo control con los cuatro biosólidos seleccionados, se procedió a preparar el ensayo de MS·3. Los sistemas MS·3 estaban constituidos por cilindros de PVC de 20 cm de diámetro y 20 cm de longitud con una fina red de nylon colocada en la parte inferior para evitar pérdidas de suelo (**Figura 3.5.**). Las columnas se rellenaron con cada una de las mezclas de biosólido y suelo control (8-10 kg), se saturaron con agua y se añadieron treinta semillas de plantas (*Triticum aestivum*, *Brassica rapa* y *Vicia sativa*) y veinte lombrices de tierra (*Eisenia andrei*) que permanecieron en el sistema MS·3 durante un periodo de 21 días (**Figura 3.6.**). El experimento se llevó a cabo en condiciones controladas de luz:oscuridad (ciclo de 16:8 h), temperatura (21 ± 1 °C) y humedad (55 - 60 %), con una irrigación diaria de 100 mL/día.



Figura 3.5. *Sistemas de suelo multiespecie MS-3. Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología, INIA, 2011.*



Figura 3.6. *Detalle de las lombrices de tierra (Eisenia andrei) utilizadas en el ensayo de MS-3. Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología, INIA, 2011.*

Los cuatro tratamientos y el control se realizaron por triplicado, aunque debido al pequeño tamaño de la muestra (especialmente en el caso de las lombrices), el análisis químico se llevó a cabo con muestras compuestas a partir de las tres réplicas. La metodología analítica aplicada para la determinación de PFAS en lombrices de tierra se detalla en la **Tabla 3.10**.

Tabla 3.10. Condiciones de extracción, purificación y análisis instrumental para la determinación de PFAS en lombriz de tierra.

Extracción	Purificación	Análisis Instrumental	Cuantificación
Matriz: Lombriz			
0,5 - 1 g muestra	<i>EnviCarb (500 mg, 6ml)</i>	HPLC-MS/MS	<i>Patrón de extracción</i>
Acetonitrilo (10 ml)	Acondicionamiento: acetonitrilo (5 ml)	Varian 212 LC-320 MS	MPFAC-MXA
Agitación (10 min)	Lavado: metanol (1 ml)	<i>Fase móvil:</i>	<i>N-d₃-MeFOSA</i>
Ultrasonicación (30 min; 40 °C)		A) 2 mM acetato amónico	<i>N-d₅-EtFOSA</i>
Centrifugación (15 min; 3000 rpm)		B) Metanol	<i>Patrón de inyección</i>
Repetición agitación, ultrasonicación y centrifugación (2 veces)		Flujo: 200 µl /min	¹³ C ₉ -PFNA
Adición ac. acético (100 µl)		<i>Columna:</i>	
Centrifugación (5 min; 2000 rpm)		ACE C18-PFP	
		(50 mm x 2,1 mm; 3 µm)	
		Tª horno: 40 °C	
		<i>Fuente: condiciones Tabla 3.3.</i>	

En las muestras de lombrices se detectaron PFOS y PFCA de cadena larga (PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA, PFDoA, PFTrDA, PFTeDA). Las lombrices procedentes de los suelos enmendados con biosólidos presentaron un intervalo de concentración (Σ PFAS) entre 9,88 ng/g m.s. y 99,9 ng/g m.s., valores notablemente superiores a los encontrados en las lombrices procedentes de suelo control (1,76 ng/g m.s.). Las concentraciones de PFOA, PFUdA, PFTrDA y PFTeDA detectadas en lombrices correlacionaron bien con los niveles descritos para biosólidos ($r = 0,877$; $p < 0,01$; test de Spearman). El mayor valor de concentración total de PFAS (Σ PFAS: 99,9 ng/g m.s.) corresponde a las lombrices procedentes del tratamiento T-2, que mostró también el valor más elevado en biosólidos ($120 \pm 15,9$ ng/g m.s.; media \pm SD) y en suelos ($2,52 \pm 1,56$ ng/g m.s.; media \pm SD). Respecto a la distribución de PFAS observada en lombrices, PFOS fue el compuesto predominante (39 %), seguido de PFTeDA y PFDoA (22 %) y PFTrDA (15 %). Aunque PFUdA, PFDoA, PFTrDA y PFTeDA, se encontraron en los biosólidos, PFTrDA y PFTeDA no se detectaron en los suelos. Su presencia en lombrices podría explicarse como consecuencia de fenómenos de bioacumulación aunque los niveles en el suelo estuvieran por debajo del límite de detección. Por otro lado, PFBS no se detectó en las lombrices aunque los niveles encontrados en suelo (0,19 ng/g m.s.) alcanzaron valores similares a los encontrados para PFOS (0,21 ng/g m.s.). Este hecho podría sugerir una tasa de bioacumulación baja para PFBS en lombrices, lo que estaría en concordancia con previos estudios llevados a cabo en organismos acuáticos (Martin y col., 2003a; Loi y col., 2011).

Tras conocer la concentración de sustancias perfluoradas en las lombrices, se procedió a calcular los factores de bioacumulación para cada compuesto de interés. Los factores de bioacumulación (BAF) son ampliamente utilizados para estimar el grado de exposición y el riesgo potencial a los que se encuentran sometidos los seres vivos, en base a los niveles de contaminación del suelo. Los BAF se calcularon dividiendo la concentración de PFAS encontrada en lombrices (ng/g m.s.) entre la concentración detectada en los suelos (ng/g m.s.). Debido a la baja variabilidad encontrada entre los diferentes tratamientos en lo que se refiere a la fracción orgánica de los suelos enmendados con biosólidos ($4 \pm 0,4$ %; media \pm SD) y el contenido lipídico de las lombrices ($9 \pm 0,3$ %; media \pm SD), los valores de BAF calculados se han considerado comparables para los cuatro tratamientos. Los valores de BAF en lombrices correlacionaron linealmente con las concentraciones totales de PFAS (Σ PFAS) en

biosólidos ($r = 0,752$; $p < 0,01$). Los valores medios de BAF se encontraron en el intervalo de 2,15 (valor correspondiente a PFOA) a 198 (correspondiente a PFDoA). Zhao y col. (2013) también obtuvieron valores de BAF elevados para PFDoA en lombrices expuestas a suelos contaminados artificialmente con PFAS. Si comparamos los valores de BAF de PFOS (20,5) y PFOA (2,15), que son dos sustancias perfluoradas con la misma longitud de cadena de carbonos, el valor obtenido para PFOS es superior. Esta predominancia de los valores de BAF de perfluoroalquil sulfonatos con respecto a los obtenidos para perfluoroalquil carboxilatos está en concordancia con otros estudios (Zhao y col., 2013; Wen y col., 2015). Los factores de bioacumulación también fueron calculados en base húmeda y resultaron similares a los obtenidos en gusanos por Loi y col. (2011).

Para estudiar si el tiempo de residencia de los compuestos en el suelo afecta a su biodisponibilidad, los factores de bioacumulación se calcularon en base a la concentración de PFAS en el suelo al principio y al final del experimento, observándose que algunos valores disminuían al aumentar el tiempo de residencia en el suelo. Sin embargo, para el caso de PFOS, que es el principal compuesto encontrado en suelos y lombrices, no se detectó ninguna variación.

Según Sijm y col. (2000), la biodisponibilidad de los contaminantes en suelo depende de las propiedades físico-químicas de los compuestos, las características del suelo, la fisiología y el hábitat de los organismos y el tiempo de residencia de los contaminantes en el suelo. Para evaluar la bioacumulación de los distintos compuestos observada en las lombrices, se estudió la relación entre los valores de BAF obtenidos y los valores de $\log K_{ow}$ de cada uno de los compuestos. El coeficiente de distribución octanol-agua (K_{ow}) es una de las principales propiedades físico-químicas utilizadas para determinar el destino medioambiental de los compuestos orgánicos hidrofóbicos, particularmente en biota (Braekevelt y col., 2003), de modo que cuanto mayor es este valor, más lipofílico es el compuesto y mayor es su tendencia a la bioacumulación (Conder y col., 2008). En el caso de PFAS, al presentar una cadena hidrofóbica y un grupo funcional hidrofílico, existe cierta controversia respecto a si K_{ow} es una propiedad adecuada para la evaluación de su destino y acumulación en el medio ambiente (Houde y col., 2006b). Aún así, la correlación encontrada entre la afinidad a la unión a proteínas que presentan las sustancias perfluoradas y la hidrofobicidad ($\log K_{ow}$) (Woodcroft 2010;

Liu y col., 2011), sugiere que es posible predecir la bioacumulación de PFAS por su valor de $\log K_{ow}$ (Zhao y col., 2013). Además, se observa como tendencia general, que un incremento del valor de $\log K_{ow}$ se corresponde con un incremento de la longitud de la cadena perfluoroalquil (Arp y col., 2006; de Voogt y col., 2012).

En la **Figura 3.7.** se establece la relación entre el factor de bioacumulación obtenido y el valor de $\log K_{ow}$ estimado mediante el modelo matemático EPISuite 4.1 (Navarro y col., 2017). Como se puede apreciar, los factores de bioacumulación se incrementaron al aumentar el valor de $\log K_{ow}$ y al aumentar la longitud de la cadena perfluoroalquil de los PFCA, tendencia similar a la descrita previamente por otros autores (Lasier y col., 2011; Zhao y col., 2013, 2014). Además, una significativa correlación lineal se observó entre los valores de $\log BAF$ y $\log K_{ow}$ ($r = 0,527$, $p < 0,01$).

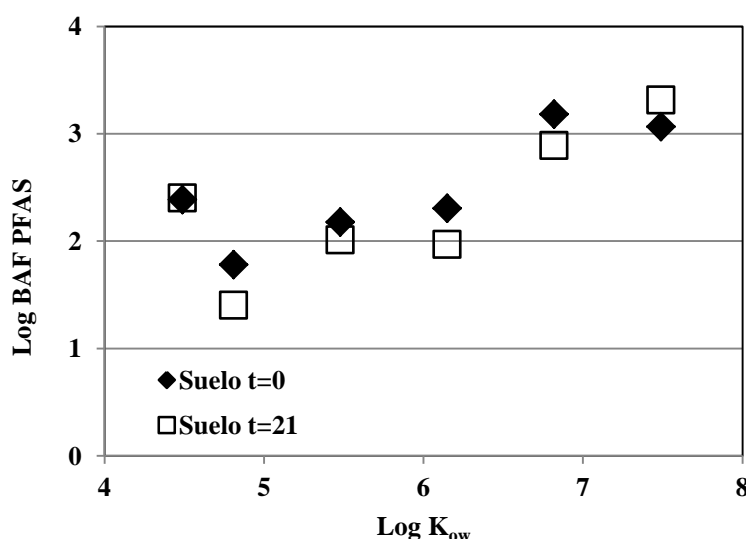


Figura 3.7. Relación de los factores de bioacumulación (BAF) de PFAS obtenidos en lombrices con el $\log K_{ow}$ de cada compuesto.

Por último, se puede concluir que el uso de sistemas de suelo multiespecie MS·3 ha permitido evaluar los efectos en organismos del suelo asociados a la aplicación de biosólidos como enmienda orgánica en suelos agrícolas. El estudio de veinte sustancias perfluoradas en biosólidos, suelos enmendados con biosólidos y lombrices de tierra expuestas a estos suelos ha demostrado la presencia y transferencia de estos contaminantes en el sistema suelo - biota. La aplicación de biosólidos contribuyó al

incremento de sustancias perfluoradas en el suelo y a la acumulación de estos compuestos en lombrices. Diferencias observadas en la bioacumulación de los contaminantes estudiados sugieren que las propiedades físico-químicas de los compuestos podrían afectar a su biodisponibilidad en el suelo y a su acumulación en los organismos vivos.

3.4. Transferencia de sustancias perfluoradas desde suelo enmendado a plantas superiores

Artículo IV:

Uptake of perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants by crop plants grown in biosolids-amended soils.

Irene Navarro, Adrián de la Torre, Paloma Sanz, Miguel Ángel Porcel, Javier Pro, Gregoria Carbonell, María de los Ángeles Martínez.

Environmental Research (2017) 152: 199-206.

Clarke y Smith (2011) identificaron a las sustancias perfluoradas como contaminantes que requieren una atención prioritaria por presentar propiedades que teóricamente les permiten entrar en la cadena alimentaria humana desde suelos enmendados con biosólidos. Por este motivo, el estudio de la transferencia de estas sustancias a diferentes plantas hortícolas cultivadas en suelos enmendados con residuos, proporciona un punto de partida para evaluar los posibles riesgos asociados a la aplicación de biosólidos en suelos agrícolas.

Los principales objetivos de este trabajo fueron:

- Determinar la transferencia, bioacumulación y distribución de los compuestos orgánicos emergentes seleccionados (las sustancias perfluoradas) desde suelos enmendados con biosólidos, en condiciones agronómicas, a plantas hortícolas.
- Estudiar la bioacumulación y distribución de PFOS en plantas de maíz (*Zea mays*) procedentes de suelo con elevada contaminación.
- Determinar la bioacumulación de los compuestos de interés en lombrices procedentes de suelo con elevada contaminación.

Hasta donde la autora conoce, este estudio es el primero en evaluar la transferencia de PFAS desde suelos enmendados con biosólidos a plantas de espinaca.

Este mismo trabajo se realizó para retardantes de llama halogenados, pero los resultados asociados no se exponen en la discusión de esta memoria por encontrarse fuera del alcance de esta Tesis.

Tres clases de plantas fueron seleccionadas para los diferentes experimentos: espinaca (*Spinacia oleracea*), tomate (*Solanum lycopersicum L.*) y maíz (*Zea mays*). En los ensayos de transferencia a espinaca y tomate (ver **Figura 3.8.** y **Figura 3.9.**), dos residuos orgánicos diferentes fueron aplicados al suelo: un lodo secado térmicamente digerido anaeróbicamente (W-1) y un compost de RSU digerido anaeróbicamente (W-2). Las tasas de aplicación de los residuos fueron calculadas en función de los requerimientos de nitrógeno de la planta y de las restricciones establecidas en la Directiva 91/676/CEE: espinaca (120 kg N/ha) y tomate (150 kg N/ha) (European Economic Community, 1991). Para estudiar la transferencia de contaminantes desde suelos con elevada contaminación, el suelo inicial fue fortificado con una concentración de PFOS de 50 mg/kg suelo y, posteriormente, se empleó para cultivar las plantas de maíz (**Figura 3.10.**). Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones controladas de luz: oscuridad (ciclo de 16:8 h), temperatura (21 ± 1 °C) y humedad (55 - 60 %), con una irrigación diaria de 100 mL/d. En los ensayos correspondientes a las plantas de espinaca y maíz, el periodo de exposición a los contaminantes fue de 28 días, mientras que las plantas de tomate permanecieron expuestas a los suelos enmendados durante seis meses (tiempo necesario para la fructificación y maduración del fruto). En el caso de los ensayos de espinaca y tomate se prepararon ocho réplicas por tratamiento, mientras que para el ensayo de maíz se prepararon seis réplicas. La metodología aplicada para el análisis de PFAS en los tejidos de las plantas estudiadas se detalla en la **Tabla 3.11.** También se prepararon macetas con suelo control (suelo no enmendado con biosólido o suelo no fortificado) y macetas con suelo libre de fertilizante. Además, después del experimento de maíz, se añadieron diez lombrices (*Eisenia andrei*) a las macetas con suelo contaminado y permanecieron allí expuestas durante un periodo de 28 días.



Figura 3.8. Ensayo de transferencia de espinaca (*Spinacia oleracea*). Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología, INIA, 2012.



Figura 3.9. Ensayo de transferencia de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología, INIA, 2012.



Figura 3.10. Ensayo de transferencia de maíz (*Zea mays*) y detalle de las lombrices de tierra (*Eisenia andrei*). Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología, INIA, 2012.

Tabla 3.11. Condiciones de extracción, purificación y análisis instrumental para la determinación de PFAS en las plantas de espinaca, tomate y maíz.

Extracción	Purificación	Análisis Instrumental	Cuantificación
Matriz: Tejido de planta			
Planta de espinaca: 1 g muestra	EnviCarb (500 mg, 6 ml - 2 g, 12ml)	HPLC-MS/MS	Patrón de extracción
Planta de tomate:	Acondicionamiento: acetonitrilo (5 ml o 10 ml)	Varian 212 LC-320 MS	MPFAC-MXA
Raíz: 1,5 g muestra	Lavado: metanol (1 ml, 4 ml)	Fase móvil:	N-d ₃ -MeFOSA
Tallo: 5 g muestra		A) 2 mM acetato amónico	N-d ₃ -EtFOSA
Hoja: 5 g muestra		B) Metanol	Patrón de inyección
Fruto: 4 - 8 g muestra		Flujo: 200 µl /min	¹³ C ₉ -PFNA
Planta de maíz:		Columna:	
Raíz: 0,01 g muestra		ACE C18-PFP	
Hoja: 0,1 - 0,4 g muestra		(50 mm x 2,1 mm; 3 µm)	
Acetonitrilo (10 ml)		Tª horno: 40 °C	
Agitación (10 min)		Fuente: condiciones Tabla 3.3.	
Ultrasonicación (30 min; 40 °C)		.	
Centrifugación (15 min; 3000 rpm)			
Repetición agitación, ultrasonicación y centrifugación			
Adición ac. acético (100 µl)			
Centrifugación (5 min; 2000 rpm)			

Se determinaron dos parámetros para evaluar la transferencia y distribución de los compuestos procedentes del suelo enmendado: el factor de transferencia (TF) y el factor de bioacumulación (BAF).

Los factores de transferencia se emplearon para evaluar la incorporación y distribución específica de cada compuesto en las plantas. Estos factores, también denominados factores de acumulación, son comúnmente empleados para evaluar la biodisponibilidad y bioconcentración de los compuestos procedentes del medio como el agua, suelo o sedimentos (Yoo y col., 2011; Felizeter y col., 2014) y su conocimiento puede ayudar a deducir el riesgo toxicológico relacionado con plantas cultivadas en suelos contaminados. Los TF se calcularon dividiendo la concentración de contaminante en la planta (ng/g m.s.) entre la concentración determinada en el suelo (ng/g m.s.). En el caso del ensayo de tomate, los factores de transferencia entre las distintas partes de la planta se calcularon también para cada compuesto, con objeto de evaluar su translocación dentro de la planta: factor de transferencia de raíz a hoja (LCF; relación entre la concentración encontrada en la hoja, ng/g m.s., y la concentración detectada en la raíz, ng/g m.s.) y factor de transferencia de hoja a fruto (ECF; relación entre la cantidad encontrada en el fruto, ng/g m.s., y la concentración determinada en la hoja, ng/g m.s.).

El factor de bioacumulación en lombriz se calculó mediante el cociente entre la concentración encontrada en lombriz (ng/g m.s.) y la concentración determinada en suelo (ng/g m.s.).

En el experimento desarrollado con las plantas de espinacas, se observó que el suelo procedente del tratamiento 1 (T-1), es decir, aquel enmendado con el lodo seco térmicamente digerido anaeróbicamente (W-1), presentó una concentración total de PFAS (6,24 ng/g m.s.) superior a la concentración encontrada en el suelo del tratamiento 2 (T-2; 0,94 ng/g m.s.), suelo enmendado con el compost de RSU digerido anaeróbicamente (W-2). En las espinacas, la concentración total de PFAS fue 5,33 ng/g m.s. y 0,99 ng/g m.s. para T-1 y T-2, respectivamente. Estas concentraciones en suelo y espinaca son coherentes con los resultados obtenidos en los propios biosólidos, ya que la concentración total de PFAS en W-1 (105 ng/g m.s.) fue superior a la de W-2 (17,5 ng/g m.s.). PFOS fue el compuesto predominante en las plantas de espinaca. El factor de transferencia obtenido para PFOS fue $4,76 \pm 1,12$ (media \pm SD). Este valor está en

concordancia con otros valores de TF para PFOS publicados en partes vegetativas de patata (3,85) y follaje de zanahoria (2,94) (Lechner y Knapp, 2011).

En el ensayo realizado en plantas de tomate la concentración total de PFAS en el suelo, después de la aplicación del biosólido, fue 7,82 ng/g m.s. y 0,88 ng/g m.s. para T-1 y T-2, respectivamente (**Tabla 3.12.**). Como se ha mencionado anteriormente, la tasa de aplicación del biosólido se calculó considerando los requerimientos de nitrógeno de la planta, lo que resultó en una baja concentración de contaminante en el suelo enmendado. No obstante, se detectaron PFAS en diferentes partes de este cultivo, indicando que la planta no solo es capaz de incorporar estos compuestos presentes en el suelo a través de las raíces, sino también de translocarlos a las partes aéreas. La concentración total de PFAS en el fruto del tomate fue $61,3 \pm 8,04$ ng/g m.s. (media \pm SD) y $3,47 \pm 1,55$ ng/g m.s. (media \pm SD) para T-1 y T-2, respectivamente.

Tabla 3.12. Concentración de PFAS (ng/g m.s.) en residuos, suelos y planta de tomate.

	Control	T-1	T-2
Biosólido	---	$105 \pm 8,34$	$17,5 \pm 1,11$
Suelo $t=0$	$0,58 \pm 0,19$	$7,82 \pm 1,60$	$0,88 \pm 0,02$
Suelo $t=final$	$0,40 \pm 0,02$	$9,17 \pm 0,90$	$0,92 \pm 0,21$
Raíz	$1,67 \pm 0,36$	$26,8 \pm 15,9$	$0,83 \pm 0,55$
Tallo	$0,06 \pm 0,86$	$26,8 \pm 4,17$	$0,89 \pm 0,85$
Hoja	$0,64 \pm 0,19$	$96,5 \pm 41,4$	$1,10 \pm 0,24$
Fruto	$2,74 \pm 2,23$	$61,3 \pm 8,04$	$3,47 \pm 1,55$

Σ PFAS: suma de PFBS, PFOS, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA y PFDoA.

Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=3).

La distribución de los compuestos en las diferentes partes de la planta muestra que PFOS (75 %) y PFCA de cadena larga: PFHpA, PFOA, PFNA; PFDA (54 - 96 %) se acumulan preferentemente en las raíces mientras que PFCA de cadena corta: PFBA,

PFPeA, PFHxA se translocan a las partes aéreas (hoja: 31 - 56 %; fruto: 32 - 48 %) (*Figura 3.11.*). Esta predominante acumulación de PFCA de cadena larga en las raíces y de cadena corta en las partes vegetativas ha sido también observada en otros estudios llevados a cabo en tomate, calabacín y repollo (Felizeter y col., 2014), maíz (Krippner y col., 2014), trigo (Wen y col., 2014) y lechuga (Felizeter y col., 2012).

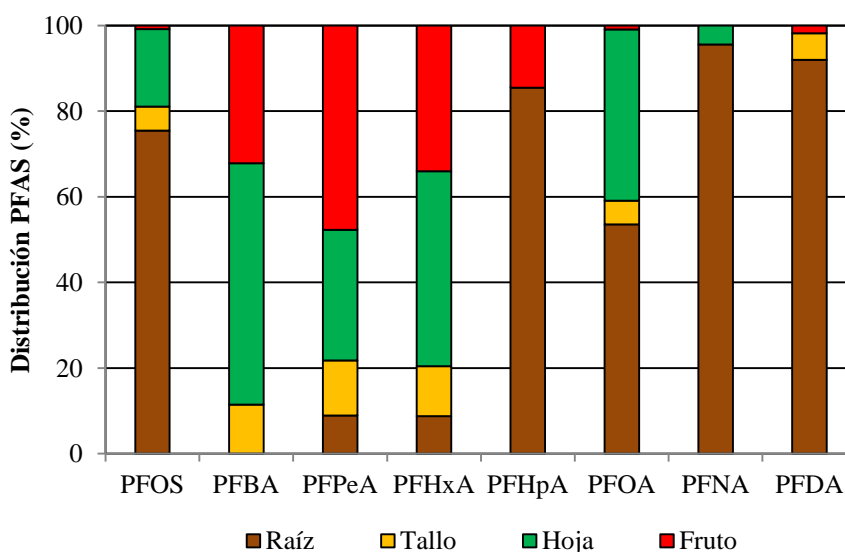


Figura 3.11. Distribución de PFAS (%) en las distintas partes de la planta de tomate.

Para caracterizar la incorporación y distribución de los compuestos en la planta del tomate, se utilizaron los factores de transferencia de cada parte de la planta. Los valores medios de TF fueron 3,44 para la raíz, 5,48 para el tallo, 22,2 para la hoja y 12,6 para el fruto. Los valores obtenidos en la raíz fueron superiores a 1, indicando una eficaz incorporación y acumulación en esta parte de la planta. Además, la mayoría de los compuestos, excepto PFBA, PFPeA y PFHxA mostraron valores de TF en raíz superiores a los obtenidos en las partes aéreas de la planta. Esto podría indicar que el transporte de estas tres sustancias desde las raíces a las partes aéreas de la planta es más efectivo (Felizeter y col., 2012; Blaine y col., 2013; Krippner y col., 2014). Los valores de TF calculados en el fruto del tomate se encontraron en el intervalo entre 0,06 y 51,5. Los valores más altos correspondieron a PFBA y PFPeA, resultado similar al obtenido por Blaine y col. (2013) en la misma especie. También se calcularon los factores de

transferencia entre las distintas partes de la planta (LCF y ECF) para evaluar su translocación dentro de la misma. Así, PFHxA y PFOA mostraron valores medios de LCF superiores a 1 y PFPeA presentó un valor medio superior a 1 tanto para LCF como para ECF. Esto podría indicar una mayor translocación de estos compuestos desde otras partes de la planta a las hojas o frutos. El valor de ECF se calculó también basado en peso húmedo para poder comparar los resultados obtenidos en esta Tesis con otros estudios: 0,01 para PFOS, 0,02 para PFBA, 0,09 para PFPeA y 0,04 para PFHxA. Aunque los valores obtenidos para PFCA en este estudio fueron inferiores a los calculados por Felizeter y col. (2014) en tomate (0,03 para PFOS, 0,14 para PFBA, 0,48 para PFPeA y 0,46 para PFHxA), el valor correspondiente a PFOS resultó muy similar. Además, el valor de ECF más elevado obtenido por Felizeter y col. (2014) fue para PFPeA, lo que es consistente con los resultados del presente estudio, indicando una mayor incorporación y translocación de este compuesto en la planta de tomate.

Considerando que K_{ow} podría ser una de las principales propiedades físico-químicas relacionadas con la incorporación y bioacumulación de estos compuestos por las plantas (McKone y Maddalena, 2007), la relación entre la translocación de los compuestos en la planta (TF) y su hidrofobicidad fue examinada. Así, se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas entre TF y $\log K_{ow}$ para PFAS en tallo ($n = 28$; $r = -0,837$; $p < 0,01$; test de Spearman), hoja ($n = 26$; $r = -0,682$; $p < 0,01$) y fruto ($n = 30$; $r = -0,929$; $p < 0,01$). Las relaciones inversas observadas entre los factores de transferencia y $\log K_{ow}$ podrían sugerir que los compuestos ligeramente más hidrofóbicos se mantienen preferentemente en las raíces mientras que los menos hidrofóbicos tienden a ser translocados desde las raíces a las partes aéreas.

En el experimento correspondiente al cultivo de maíz, la presencia de PFOS, PFBS y PFHxS se detectó en las raíces y en las hojas de la planta. La tasa de reducción de PFOS en el suelo al comparar las concentraciones obtenidas antes y después del desarrollo de la planta varió de 48 a 64 %. La disipación de PFOS en el suelo puede ser debida a varios factores como la degradación, volatilización y la incorporación a plantas. Stahl y col. (2013) documentaron la presencia de PFBS y PFHxS en la mezcla comercial de PFOS, resultando la suma de ambos compuestos aproximadamente 1,5 %. Estos compuestos presentaron en el suelo una composición similar a la encontrada en la mezcla comercial y además, no variaron de una forma significativa durante todo el experimento,

lo que indica una baja degradación de PFOS en los suelos. Además, el ensayo se realizó en condiciones controladas de humedad y temperatura, por lo que la influencia de volatilización también puede considerarse baja. En cambio, en la literatura se ha descrito que el proceso de plantación y desarrollo de una planta contribuye a la disipación de contaminantes en el suelo debido al metabolismo microbiano y a la bioestimulación de comunidades de microorganismos (Huang y col., 2011). Por otro lado, la acumulación de PFOS en las hojas podría ser debida a una combinación de la incorporación a través del suelo y una incorporación por deposición a través del aire. La concentración obtenida en las hojas de plantas crecidas en suelo no fortificado con PFOS (suelo control) fue 0,001 $\mu\text{g/g}$, lo que supone un 1 % de la concentración obtenida en las hojas de plantas desarrolladas en suelo fortificado. Esto implica, que no hay una contribución importante debida a la incorporación de contaminante por deposición a través del aire.

La distribución de PFAS en las diferentes partes de la planta permitió evaluar la translocación de los distintos compuestos, observándose que PFOS (89 %) se acumula mayoritariamente en la raíz mientras que PFBS (88 %) y PFHxS (82 %) se encuentran principalmente en las hojas (*Figura 3.12.*).

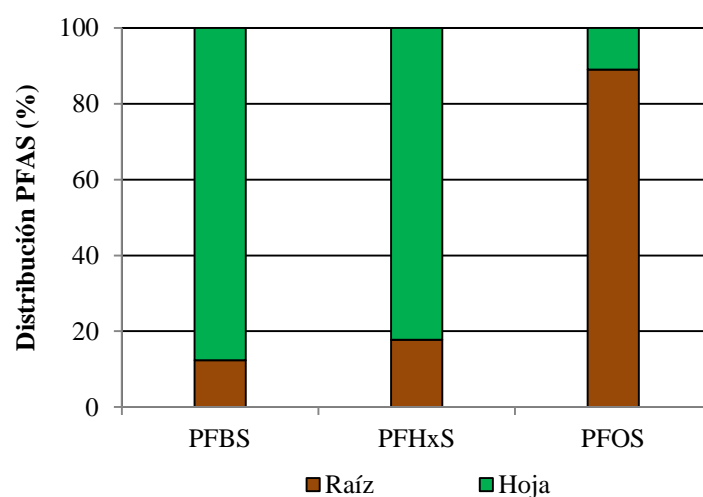


Figura 3.12. Distribución de PFAS (%) en la planta de maíz.

Los factores de transferencia en las diferentes partes de la planta de maíz fueron: 6,98 (PFOS), 5,00 (PFBS) y 2,25 (PFHxS) en raíz, y 10,8 (PFHxS), 4,00 (PFBS) y 0,88 (PFOS) en hojas.

El estudio de las lombrices expuestas en el suelo fortificado con PFOS, después de la recogida de las plantas de maíz, puso de manifiesto la bioacumulación de PFBS ($0,09 \pm 0,03 \mu\text{g/g m.s.}$; media \pm SD), PFHxS ($3,06 \pm 0,18 \mu\text{g/g m.s.}$; media \pm SD) y principalmente PFOS ($79,5 \pm 7,35 \mu\text{g/g m.s.}$; media \pm SD). Los valores de BAF obtenidos fueron: 4,99 (PFOS), 3,46 (PFHxS) y 2,45 (PFBS), siendo el valor correspondiente a PFOS coherente con el valor calculado en otros estudios realizados en lombrices: 1,54 - 4,12 (Wen y col., 2015) y 2,94 - 4,19 (Zhao y col., 2014).

Por último, se puede concluir que en este ensayo, veinte PFAS fueron estudiadas para evaluar su comportamiento y distribución en los sistemas suelo - planta y suelo - lombriz. Se ha demostrado que la contaminación del suelo con los compuestos emergentes seleccionados, como resultado de la aplicación de biosólidos o por un accidente de contaminación (suelo con elevada contaminación), puede ser transferida a las diferentes partes de las plantas a través de las raíces y también a los organismos invertebrados que se encuentran en contacto directo con el suelo contaminado. Respecto a la translocación de PFAS en las plantas, se observó una predominante acumulación de los compuestos de cadena larga en las raíces y una significativa acumulación de los compuestos de cadena corta en las partes aéreas.

3.5. Evaluación del riesgo asociado a la aplicación agrícola de biosólidos en relación a PFOS y PFOA

Con objeto de valorar el riesgo asociado a la aplicación agrícola de biosólidos en suelo, se ha llevado a cabo una evaluación en tres etapas: i) estimación de la exposición ambiental, ii) valoración de los efectos y iii) valoración del riesgo. Para ello se han seguido las recomendaciones de la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA, *European Chemicals Agency*) recogidas en el Documento de orientación sobre los requisitos de información y la valoración de la seguridad química (*Guidance on information requirements and chemical safety assessment*) y más concretamente se ha tenido en cuenta: i) el capítulo R.16 (*Environmental Exposure Assessment*; ECHA, 2016a) para la obtención de los niveles de exposición ambiental, ii) el capítulo R.10 (*Characterisation of dose [concentration]-response for environment*; ECHA, 2008) para la valoración de los efectos y iii) la parte E (*Risk Characterisation*; ECHA, 2016b) para la valoración del riesgo.

A continuación se describen las distintas aproximaciones realizadas. Las propiedades físico-químicas de las sustancias perfluoradas consideradas, así como los distintos parámetros necesarios para la realización de esta estimación se detallan en el *Anexo VI* de esta memoria.

3.5.1. Estimación de la exposición ambiental

La exposición ambiental a una determinada sustancia es el resultado de su emisión al medio, y su posterior distribución o degradación en el mismo (ECHA, 2016a).

La estimación de la exposición y distribución ambiental de una sustancia contaminante está basada en la obtención de la concentración ambiental prevista, PEC (por sus siglas en inglés, *Predicted Environmental Concentration*) en los distintos compartimentos medioambientales. En el presente estudio se han considerado el compartimento del suelo y el compartimento biota para evaluar la influencia del potencial de contaminación secundaria a través de la cadena trófica terrestre. Las recomendaciones de la ECHA (R.16.2. *Release assessment*; ECHA, 2016a) relativas al

cálculo de los valores PEC, indican que la fuente de contaminación estudiada (aplicación agrícola de biosólidos de EDAR) constituye una emisión directa al suelo a escala local, por lo que se ha considerado un escenario de exposición de tipo local. En este caso, el aporte de contaminantes al suelo debido a fenómenos de deposición atmosférica se ha desestimado al presentar muy baja influencia en comparación con el aporte directo debido a la enmienda agrícola.

Primeramente se calculó el valor de PEC en el compartimento del suelo. Para ello, se ha utilizado la ecuación descrita a continuación (A.16-3.3.6. *Calculation of PEC_{local} for the soil compartment*; ECHA, 2016a).

$$PEC_{\text{suelo}}(n) = C_{\text{suelo}}(0) \times \left[1 + \sum_{n=1}^{n-1} F_{\text{acc}}^n \right]$$

donde $PEC_{\text{suelo}}(n)$ corresponde a la concentración inicial de contaminante en el suelo después de n aplicaciones de lodo, $C_{\text{suelo}}(0)$ es la concentración inicial en el suelo después de la primera aplicación de lodo y F_{acc} es la fracción de sustancia que permanece en el suelo al final de un año (fracción de acumulación en un año). La concentración de una sustancia justo después de la aplicación del lodo será elevada, sin embargo al final del año será más baja como consecuencia de los fenómenos de disipación.

Los resultados obtenidos para la estimación de la exposición ambiental del suelo a las sustancias perfluoradas PFOS (**Tabla 3.13.**) y PFOA (**Tabla 3.14.**), como consecuencia de la aplicación sucesiva de los distintos biosólidos seleccionados para los experimentos realizados en este trabajo, indican que la concentración de estos contaminantes en el suelo permanece constante a partir de los 10 años.

Los cuatro biosólidos considerados (W-1, W-2, W-3 y W-4) han sido los mismos que se evaluaron en el estudio de transferencia de PFAS a las aguas de lixiviación y escorrentía, y en el ensayo con los sistemas de suelo multiespecie MS-3. Además, dos de ellos, también se utilizaron en el estudio de transferencia a plantas hortícolas.

Tabla 3.13. Exposición ambiental del suelo a PFOS como consecuencia de la aplicación de biosólidos a lo largo del tiempo.

		W-1	W-2	W-3	W-4
C_{residuo}	mg/kg	1,46E-02	2,82E-02	6,44E-02	6,50E-04
APPL_{residuo}	kg/m ² año	5,2	1,8	1,2	5,9
C_{suelo} (0)	mg/kg	2,23E-04	1,49E-04	2,27E-04	1,13E-05
PEC_{suelo} (1 año)	mg/kg	1,49E-04	9,99E-05	1,52E-04	7,55E-06
PEC_{suelo} (10 años)	mg/kg	3,86E-04	2,58E-04	3,92E-04	1,95E-05
PEC_{suelo} (25 años)	mg/kg	3,86E-04	2,58E-04	3,92E-04	1,95E-05
PEC_{suelo} (50 años)	mg/kg	3,86E-04	2,58E-04	3,92E-04	1,95E-05
PEC_{suelo} (100 años)	mg/kg	3,86E-04	2,58E-04	3,92E-04	1,95E-05

C_{residuo}: Concentración de PFOS en los biosólidos.

APPL_{residuo}: Tasa de aplicación del biosólido.

C_{suelo}(0): Concentración de PFOS en el suelo después de la primera aplicación de los biosólidos.

Tabla 3.14. Exposición ambiental del suelo a PFOA como consecuencia de la aplicación de biosólidos a lo largo del tiempo.

		W-1	W-2	W-3	W-4
C_{residuo}	mg/kg	3,65E-03	8,90E-03	9,35E-03	2,52E-03
APPL_{residuo}	kg/m ² año	5,2	1,8	1,2	5,9
C_{suelo} (0)	mg/kg	5,58E-05	4,71E-05	3,30E-05	4,37E-05
PEC_{suelo} (1 año)	mg/kg	2,36E-06	1,99E-06	1,39E-06	1,85E-06
PEC_{suelo} (10 años)	mg/kg	5,58E-05	4,71E-05	3,30E-05	4,37E-05
PEC_{suelo} (25 años)	mg/kg	5,58E-05	4,71E-05	3,30E-05	4,37E-05
PEC_{suelo} (50 años)	mg/kg	5,58E-05	4,71E-05	3,30E-05	4,37E-05
PEC_{suelo} (100 años)	mg/kg	5,58E-05	4,71E-05	3,30E-05	4,37E-05

C_{residuo}: Concentración de PFOA en los biosólidos.

APPL_{residuo}: Tasa de aplicación del biosólido.

C_{suelo}(0): Concentración de PFOA en el suelo después de la primera aplicación de los biosólidos.

Una vez obtenido el valor de PEC en el compartimento del suelo, se calculó la concentración ambiental prevista en el alimento de los depredadores, $PEC_{\text{oral, depredador}}$ (*Predicted environmental concentration in food*). Este valor se ha utilizado para evaluar la influencia del potencial de contaminación secundaria a través de la cadena trófica terrestre, utilizándose la aproximación de la siguiente cadena trófica: suelo → lombriz → depredadores que se alimentan de lombrices (como pájaros y mamíferos) (ECHA, 2016a). Las lombrices pueden contener cantidades sustanciales de suelo, por lo que la exposición de los depredadores puede verse afectada por la cantidad de contaminante presente en este suelo. Por ello, la estimación de PEC en los depredadores ($PEC_{\text{oral, depredador}}$) se calcula a través de la concentración total de contaminante presente en la lombriz. Dicha concentración considera la bioacumulación del contaminante en los propios tejidos de la lombriz así como la concentración del contaminante procedente del suelo contenido en el intestino de la lombriz (A16.-3.3.8. *Predators (secondary poisoning)*, ECHA, 2016a):

$$PEC_{\text{oral, depredador}} = \frac{BCF_{\text{lombriz}} \times PEC_{\text{agua poro}} + PEC_{\text{suelo}} \times F_{\text{intestino}} \times CONV_{\text{suelo}}}{1 + F_{\text{intestino}} \times CONV_{\text{suelo}}}$$

donde BCF_{lombriz} corresponde al factor de bioconcentración del contaminante en lombriz (en peso húmedo), $PEC_{\text{agua poro}}$ es la concentración de la sustancia en el agua del poro o agua intersticial, PEC_{suelo} es la concentración de la sustancia en el suelo, $F_{\text{intestino}}$ es la fracción de la carga intestinal de la lombriz y $CONV_{\text{suelo}}$ es el factor de conversión de la concentración del suelo en peso húmedo y seco.

A continuación se detallan los resultados obtenidos en la estimación de la exposición ambiental de los depredadores a las sustancias perfluoradas PFOS (**Tabla 3.15.**) y PFOA (**Tabla 3.16.**) a través de la cadena trófica terrestre.

Tabla 3.15. Exposición ambiental de los depredadores a PFOS.

		W-1	W-2	W-3	W-4
BCF_{lombriz}	L/kg	3,72E+02	3,72E+02	3,72E+02	3,72E+02
PEC_{agua poro}	mg/L	6,57E-06	4,39E-06	6,69E-06	3,32E-07
PEC_{suelo promedio (1 año)}	mg/kg	1,49E-04	9,99E-05	1,52E-04	7,55E-06
PEC_{oral, depredador}	mg/kg	2,21E-03	1,48E-03	2,25E-03	1,12E-04

BCF_{lombriz}: Factor de bioconcentración en lombriz (peso húmedo).

PEC_{agua poro}: Concentración de PFOS en el agua de poro.

PEC_{suelo promedio (1 año)}: Concentración promediada de PFOS en el suelo durante un año.

Tabla 3.16. Exposición ambiental de los depredadores a PFOA.

		W-1	W-2	W-3	W-4
BCF_{lombriz}	L/kg	7,76E+02	7,76E+02	7,76E+02	7,76E+02
PEC_{agua poro}	mg/L	4,00E-07	3,38E-07	2,36E-07	3,13E-07
PEC_{suelo promedio (1 año)}	mg/kg	2,36E-06	1,99E-06	1,39E-06	1,85E-06
PEC_{oral, depredador}	mg/kg	2,79E-04	2,35E-04	1,65E-04	2,18E-04

BCF_{lombriz}: Factor de bioconcentración en lombriz (peso húmedo).

PEC_{agua poro}: Concentración de PFOA en el agua de poro.

PEC_{suelo promedio (1 año)}: Concentración promediada de PFOA en el suelo durante un año.

3.5.2. Valoración de los efectos

La evaluación cuantitativa de los efectos de un contaminante en el medio ambiente se lleva a cabo mediante la determinación de la concentración de la sustancia por debajo de la cual no se esperan efectos adversos (*Predicted No-Effect Concentrations*, por sus siglas en inglés, PNEC) (ECHA, 2008). Para ello, es necesario conocer la concentración ambiental que no produce efecto en organismos del suelo (PNEC_{suelo}) y la concentración sin efecto debida a la ingesta oral (PNEC_{oral}). El valor de PNEC_{oral} indica el efecto potencial como resultado de una toxicidad secundaria en organismos pertenecientes a un nivel trófico alto, debido a la ingesta de organismos de

un nivel inferior que presentan contaminantes acumulados, efecto debido por tanto al fenómeno de biomagnificación.

Los valores de PNEC utilizados para la evaluación de riesgo en esta Tesis (**Tabla 3.17.**) proceden de la bibliografía y se han obtenido mediante ensayos de toxicidad realizados en laboratorios a los que se les ha aplicado el factor de evaluación apropiado (ECHA, 2008).

Tabla 3.17. Evaluación de los efectos de PFOS y PFOA en el compartimento terrestre y en los organismos de niveles superiores de la cadena trófica.

		PFOS	PFOA
PNEC_{suelo}	mg/kg	1,00E-01 ^a	1,60E-01 ^a
PNEC_{oral}	mg/kg	1,67E-02 ^b	1,58E-01 ^c

^aSFT, 2008.

^bBrooke y col., 2004.

^cEnvironment Canada, 2012.

3.5.3. Valoración del riesgo

La valoración del riesgo se ha realizado mediante la determinación de los cocientes de caracterización de riesgo (*Risk Characterization Ratios*, por sus siglas en inglés, RCR), para el suelo y para los depredadores, a partir de los valores correspondientes de PEC y PNEC (ECHA, 2016b).

$$RCR = \frac{PEC}{PNEC}$$

La concentración del contaminante en el suelo (PEC_{suelo}) es comparada con la concentración por debajo de la cual no se esperan efectos adversos para organismos del suelo (PNEC_{suelo}). Asimismo, la concentración del contaminante en organismos del suelo (PEC_{oral,depredador}) se compara con la concentración por debajo de la cual no se esperan

efectos adversos para depredadores que se alimentan de lombrices, como mamíferos y pájaros, ($PNEC_{oral}$).

Los cocientes obtenidos para los compuestos evaluados, tanto para RCR_{suelo} como RCR_{oral} se detallan en la **Tabla 3.18**. Estos valores son inferiores a 1, lo que indica que no existe riesgo para los organismos del suelo ni riesgo de intoxicación secundaria para los depredadores que se alimenten de estos.

Tabla 3.18. Cocientes de caracterización de riesgo obtenidos para PFOS y PFOA para cada uno de los cuatro biosólidos estudiados.

	W-1	W-2	W-3	W-4
PFOS				
RCR_{suelo}	1,49E-03	9,99E-04	1,52E-03	7,55E-05
RCR_{oral}	1,32E-01	8,84E-02	1,35E-01	6,68E-03
PFOA				
RCR_{suelo}	1,47E-05	1,24E-05	8,71E-06	1,15E-05
RCR_{oral}	1,77E-03	1,49E-03	1,04E-03	1,38E-03

La evolución de los cocientes de caracterización de riesgo a lo largo del tiempo, como consecuencia de la aplicación anual de residuos al suelo, indica que la constante en el riesgo se alcanza después de la aplicación del residuo durante 10 años (**Figura 3.13.**). Como se puede observar, los valores de RCR tanto para PFOS como para PFOA son muy inferiores a 1 en todos los supuestos considerados.

Por tanto, en las condiciones ensayadas y para las sustancias perfluoradas seleccionadas, PFOS y PFOA, los valores de RCR obtenidos sugieren que los riesgos asociados al uso de biosólidos como enmiendas orgánicas en suelos agrícolas, se consideran adecuadamente controlados.

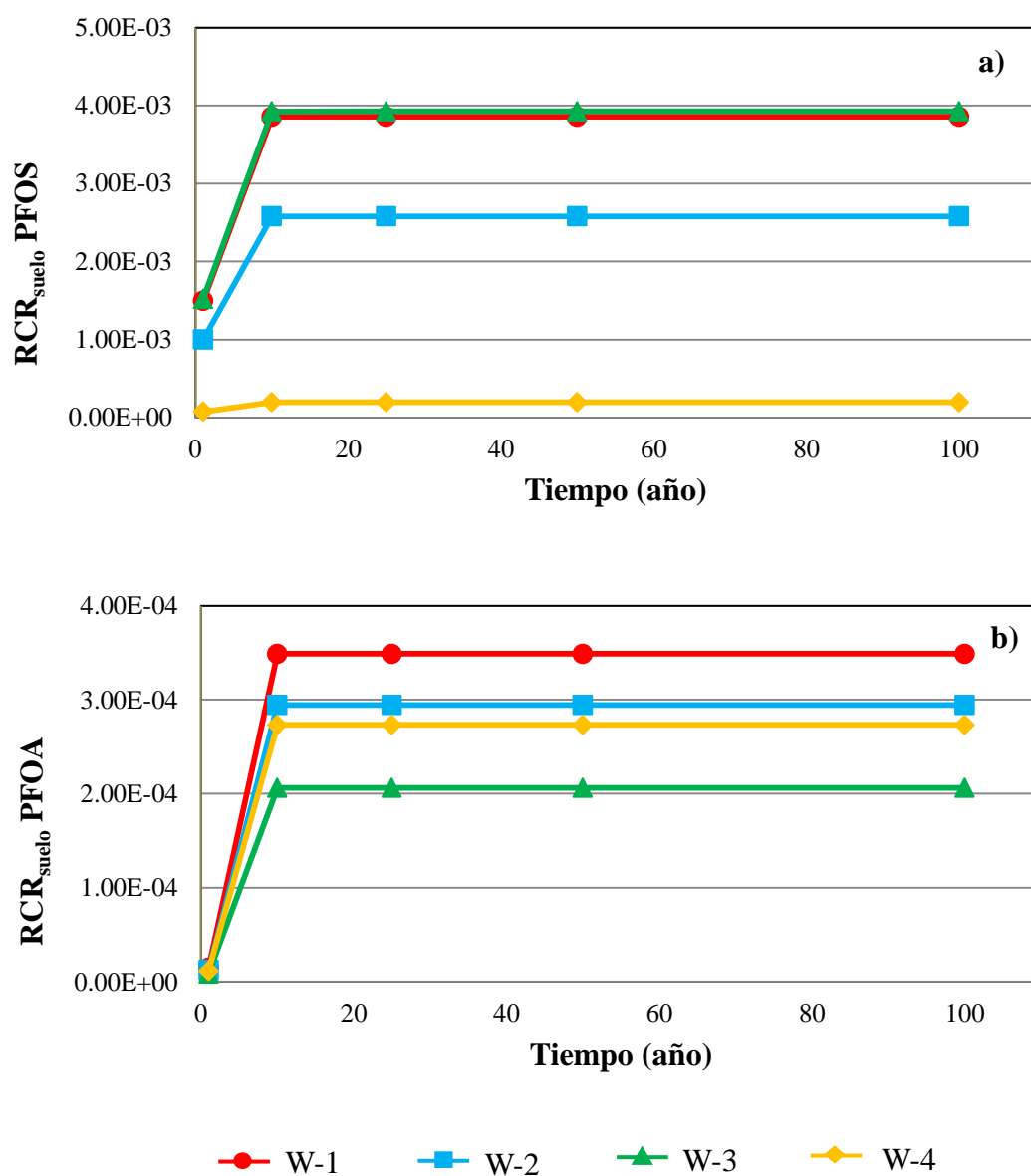


Figura 3.13. Evolución del riesgo para los organismos del suelo como resultado de la aplicación periódica de biosólidos al suelo, en relación a PFOS (a) y PFOA (b).

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

A continuación se detallan las conclusiones más relevantes que se obtienen de los resultados expuestos en la presente memoria. Estas se han clasificado de acuerdo a los objetivos generales propuestos:

A) Optimización y validación de la metodología analítica para la determinación de sustancias perfluoradas en distintas matrices medioambientales.

1. Se ha desarrollado un método efectivo para el análisis de perfluoroalquil sulfonatos, perfluoroalquil carboxilatos, y perfluorooctano sulfonamidas a nivel traza en matrices medioambientales. Dicho método está basado en una primera etapa de extracción, consistente en la combinación de agitación, ultrasonicación y centrifugación, seguida de una etapa de purificación de los extractos mediante la técnica de extracción en fase sólida. La separación de los analitos de interés y su posterior detección se ha llevado a cabo mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS/MS).
2. La metodología optimizada en primer lugar con patrones, se ha validado en diferentes matrices medioambientales, a través de la participación en diversos ejercicios internacionales de intercomparación (agua, sedimento, pez) y el uso de muestras preparadas de concentración conocida (tierra silíceas y lodo de EDAR).

B) Aplicación a muestras medioambientales de la metodología analítica desarrollada.

3. La aplicación de la metodología desarrollada en el análisis de veinte muestras de lodo procedentes de estaciones de depuración de aguas residuales distribuidas por toda la geografía nacional revela la presencia de sustancias perfluoradas en un intervalo de concentración de 0,34 a 287 ng/g m.s., siendo PFOS el compuesto que presenta mayores niveles de

concentración. Teniendo en cuenta el nivel límite establecido en Alemania de 100 µg/kg m.s. para la suma de PFOS y PFOA para lodos de EDAR utilizados en agricultura, es importante señalar que el 20 % de las muestras estudiadas excedieron este límite significativamente, debido principalmente a la contribución de PFOS.

4. La presencia de sustancias perfluoradas en biosólidos, suelos enmendados con biosólidos y aguas de lixiviación y escorrentía, objeto principal de estudio en el ensayo de semicampo, demuestra la movilidad y transferencia de estos contaminantes emergentes a diferentes compartimentos medioambientales, como consecuencia de la aplicación de biosólidos en suelos agrícolas. Se observó una elevada movilidad de PFOS a través del suelo mediante aguas de lixiviación y escorrentía. Los más altos niveles de concentración de PFOS en el agua de escorrentía en comparación con los detectados en el agua de lixiviación, indican que los fenómenos de transporte por escorrentía podrían constituir la ruta de transferencia preferencial de este contaminante a través de los diferentes compartimentos medioambientales.
5. La utilización de sistemas de suelo multiespecie MS•3 ha permitido evaluar los efectos asociados a la aplicación de biosólidos en suelo agrícola en los organismos invertebrados del suelo. El estudio de PFAS en biosólidos, suelos enmendados con biosólidos y lombrices de tierra expuestas a estos suelos indica la presencia y transferencia de estos contaminantes en el sistema suelo - invertebrados del suelo. La aplicación de biosólidos contribuyó al incremento de sustancias perfluoradas en el suelo y a la acumulación de estos compuestos en las lombrices. Las diferencias observadas en la bioacumulación de los contaminantes estudiados sugieren que sus propiedades físico-químicas podrían afectar a su biodisponibilidad en el suelo y a su acumulación en los organismos vivos.
6. Se ha evaluado el comportamiento y la distribución de las sustancias perfluoradas seleccionadas en los sistemas suelo - planta y suelo - lombriz.

Se ha demostrado que la contaminación del suelo con los compuestos emergentes estudiados, bien como resultado de la aplicación de biosólidos como enmienda orgánica o bien por una fuente de contaminación (suelo con elevada contaminación), puede ser transferida a las diferentes partes de las plantas a través de las raíces y también a los organismos invertebrados que se encuentran en contacto directo con el suelo contaminado. Respecto a la translocación de PFAS en las plantas, se observó una predominante acumulación de los compuestos de cadena larga en las raíces mientras que aparece una significativa acumulación de los compuestos de cadena corta en las partes aéreas.

7. En las condiciones ensayadas y para las sustancias perfluoradas seleccionadas, PFOS y PFOA, los valores del cociente de caracterización de riesgo son muy inferiores a la unidad, $\ll 1$, sugiriendo que los riesgos asociados al uso de biosólidos como enmiendas orgánicas en suelos agrícolas se pueden considerar adecuadamente controlados.
8. Teniendo en cuenta la importancia que tiene la utilización de lodos de EDAR como enmienda en la agricultura en España y también en varios países de la Unión Europea, se debería realizar una investigación más extensa con objeto de evaluar el contenido de estos contaminantes orgánicos emergentes en dichos lodos y evitar su presencia en el suelo y su posible transferencia a los distintos compartimentos medioambientales y a la cadena trófica.

BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- 3M Company, 2000a. Sulfonated perfluorochemicals in the environment: sources, dispersion, fate and effects. St. Paul, M.N.
- 3M Company, 2000b. Phase-Out Plan for POSF-Based products. US EPA Administrative Record AR226-0600. <http://www.fluoridealert.org/pesticides/pfos.fr.final.docket.0009.pdf> Accesible en Marzo 2017.
- 3M Company, 2003. Moore, J., Rodericks, J., Turnbull, D., Warren-Hicks, W. Environmental and health assessment of perfluorooctane sulfonic acid and its salts.

A

- Ahmed, F.E., 2001. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. Trends Anal. Chem. 20, 649-661.
- Ahmed, F.E., 2003. Analysis of polychlorinated biphenyls in food products. Trends Anal. Chem. 22, 170-185.
- Ahrens, L., Taniyasu, S., Yeung, L.W.Y., Yamashita, N., Lam, P.K.S., Ebinghaus, R., 2010. Distribution of polyfluoroalkyl compounds in water, suspended particulate matter and sediment from Tokyo Bay, Japan. Chemosphere 79, 266-272.
- Ahrens, L., Herzke, D., Huber, S., Bustnes, J.O., Bangjord, G., Ebinghaus, R., 2011a. Temporal trends and pattern of polyfluoroalkyl compounds in Tawny Owl (*Strix aluco*) eggs from Norway, 1986-2009. Environ. Sci. Technol. 45, 8090-8097.
- Ahrens, L., Shoeib, M., del Vento, S., Codling, G., Halsall, C., 2011b. Polyfluoroalkyl compounds in the Canadian Arctic atmosphere. Environ. Chem. 8, 399-406.
- Ahrens, L., 2011c. Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate. J. Environ. Monit. 13, 20-31.
- Ahrens, L., Shoeib, M., Harner, T., Lee, S.C., Guo, R., Reiner E.J., 2011d. Wastewater treatment plant and landfills as sources of polyfluoroalkyl compounds to the atmosphere. Environ. Sci. Technol. 45, 8098-8105.

- Ahrens, L., Harner, T., Shoeib, M., Lane, D.A., Murphy, J.G., 2012. Improved characterization of gas-particle partitioning for per- and polyfluoroalkyl substances in the atmosphere using annular diffusion denuder samplers. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7199-7206.
- Alzaga, R., Bayona, J.M., 2004. Determination of perfluorocarboxylic acids in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction–in-port derivatization–gas chromatography–negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1042, 155-162.
- Aparicio, I., Santos, J.L., Alonso, E., 2009. Limitation of the concentration of organic pollutants in sewage sludge for agricultural purposes: A case study in South Spain. *Waste Manage.* 29, 1747-1753.
- Appleman, T.D., Dickenson, E.R.V., Bellona, C., Higgins, C.P., 2013. Nanofiltration and granular activated carbon treatment of perfluoroalkyl acids. *J. Hazard. Mater.* 260, 740-746.
- Armitage, J.M., MacLeod, M., Cousins, I.T., 2009. Comparative assessment of the global fate and transport pathways of long-chain perfluorocarboxylic acids (PFCAs) and perfluorocarboxylates (PFCs) emitted from direct sources, *Environ. Sci. Technol.* 43, 5830-5836.
- Arp, H.P., Niederer, C., Goss, K., 2006. Predicting the partitioning behavior of various highly fluorinated compounds. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7298-7304.
- Arsenault, G., Chittim, B., Gu, J., McAlees, A., McCrindle, R., Robertson, V., 2008. Separation and fluorine nuclear magnetic resonance spectroscopic (^{19}F NMR) analysis of individual branched isomers present in technical perfluorooctanesulfonic acid (PFOS). *Chemosphere* 73, S53-S59.
- Arvaniti, O.S., Andersen, H.R., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., 2014. Sorption of perfluorinated compounds onto different types of sewage sludge and assessment of its importance during wastewater treatment. *Chemosphere* 111, 405-411.
- Arvaniti, O.S., Hwang, Y., Andersen, H.R., Stasinakis, A.S., Thomaidis, N.S., Aloupi, M., 2015. Reductive degradation of perfluorinated compounds in water using Mg-aminoclay coated nanoscale zero valent iron. *Chem. Eng. J.* 262, 133-139.
- Arvaniti, O.S., Stasinakis, A.S., 2015. Review on the occurrence, fate and removal of perfluorinated compounds during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 524-525, 81-92.

B

- Backe, W.J., Day, T.C., Field, J.A., 2013. Zwitterionic, cationic, and anionic fluorinated chemicals in aqueous film forming foam formulations and groundwater from U.S. military bases by nonaqueous large-volume injection HPLC-MS/MS. *Environ. Sci. Technol.* 47, 5226-5234.
- Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., van Leeuwen, S.P.J., 2010. Tetrahydrofuran-water extraction, in-line clean-up and selective liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the quantitation of perfluorinated compounds in food at the low picogram per gram level. *J.Chromatogr. A*, 1217, 5913-5921.
- Benskin, J.P., Bataineh, M., Martin, J.W., 2007. Simultaneous characterization of perfluoroalkyl carboxylate, sulfonate, and sulfonamide isomers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79, 6455-6464.
- Benskin, J.P., de Silva, A.O., Martin, J.W., 2010. Isomer profiling of perfluorinated substances as a tool for source tracking: a review of early findings and future applications. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 208, 111-160.
- Berger, U., Kaiser, M.A., Kärrman, A., Barber, J.L., van Leeuwen, S.P.J., 2011. Recent developments in trace analysis of poly- and perfluoroalkyl substances. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1625-1635.
- Blaine, A.C., Rich, C.D., Hundal, L.S., Lau, C., Mills, M.A., Harris, K.M., Higgins, C.P., 2013. Uptake of perfluoroalkyl acids into edible crops via land applied biosolids: field and greenhouse studies. *Environ. Sci. Technol.* 47, 14062-14069.
- Boleas, S., Alonso, C., Pro, J., Babín, M.M., Fernández, C., Carbonell, G., Tarazona, J.V., 2005. Effects of sulfachlorpyridazine in MS·3 arable land: a multispecies soil system for assessing the environmental fate and effects of veterinary medicines. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 811-819.
- Boulanger, B., Peck, A.M., Schnoor, J.L., Hornbuckle, K.C., 2005. Mass budget of perfluorooctane surfactants in Lake Ontario. *Environ. Sci. Technol.* 39, 74-79.
- Braekevelt, E., Tittlemier, S.A., Tomy, G.T., 2003. Direct measurement of octanol-water partition coefficients of some environmentally relevant brominated diphenyl ether congeners. *Chemosphere* 51, 563-567.
- Brooke, D., Footitt, A., Nwaogu, T.A., 2004. Environmental risk evaluation report: perfluorooctanesulfonate (pfos).

Buck, R.C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J.M., Cousins, I.T., de Voogt, P., Jensen, A.A., Kannan, K., Mabury, S.A., van Leeuwen, S.P.J., 2011. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 513-541.

Butt, C.M., Berger, U., Bossi, R., Tomy, G.T., 2010. Levels and trends of poly- and perfluorinated compounds in the arctic environment. *Sci. Total Environ.* 408, 2936-2965.

C

Carbonell, G., Pro, J., Gómez, N., Babín, M.M., Fernández, C., Alonso, E., Tarazona, J.V., 2009. Sewage sludge applied to agricultural soil: ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1309-1319.

Casanovas, J., Ramos, L., Llorens, J., Fernández, M., Fraisse, D., Gavinelli, M., Cristofori, C., González, M.J., Jiménez, B., Rivera, J., Espadaler, I., Eljarrat, E., 1996. Dioxinas y Furanos. Problemática ambiental y metodología analítica. Series monográficas, Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente

Clarke, B.O., Smith, S.R., 2011. Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ. Inter.* 37, 226-247.

Conder, J.M., Hoke, R.A., de Wolf, W., Russell, M.H., Buck, R.C., 2008. Are PFCAs bioaccumulative? A critical review and comparison with regulatory criteria and persistent lipophilic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 42, 995-1003.

Consortium ESWI (Expert Team to Support Waste Implementation), 2011. Study on waste related issues of newly listed POPs and candidate POPs. Consortium ESWI on behalf of the European Commission, DG Environment, Final Report. ENV.G.4/FRA/2007/0066.
http://ec.europa.eu/environment/waste/studies/pdf/POP_Waste_2010.pdf
Accesible en Marzo 2017.

COP, 2001. The Stockholm Convention on persistent organic pollutants, 2001.

COP, 2009. Fourth meeting of the Conference of the Parties to the Stockholm Convention (COP4). Earth Negotiations Bulletin, International Institute for Sustainable Development (IISD), 15.

Cousins, I.T., Kong, D., Vestergren, R., 2011. Reconciling measurement and modelling studies of the sources and fate of perfluorinated carboxylates. *Environ. Chem.* 8, 339-354.

D

- de Boer, J., Esparza, X., van Leeuwen, S.P.J., Moyano, E., Galceran, M.T., 2010. Analysis of perfluorinated phosphonic acids in water, sludge and sediment samples by LC-MS/MS. *Organohalogen Comp.* 72, 956-959.
- de la Torre, A., Sverko, E., Alaee, M., Martínez, M.A., 2011a. Concentrations and sources of dechlorane plus in sewage sludge. *Chemosphere* 82, 692-697.
- de la Torre, A., Alonso, E., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2011b. Sources and behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in Spanish sewage sludge. *Waste Manage.* 31, 1277-1284.
- de Silva, A.O., Mabury, S.A., 2004. Isolating isomers of perfluorocarboxylates in polar bears (*Ursus maritimus*) from two geographical locations. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6538-6545.
- de Voogt, P., Sáez, M., 2006. Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances. *Trends Anal. Chem.* 25, 326-342.
- de Voogt, P., Zurano, L., Serné, P., Haftka J.J.H., 2012. Experimental hydrophobicity parameters of perfluorinated alkylated substances from reversed-phase highperformance liquid chromatography. *Environ. Chem.* 9, 564-570.
- D'eon, J.C., Crozier, P.W., Furdui, V.I., Reiner, E.J., Libelo, E.L., Mabury, S.A., 2009. Observation of a commercial fluorinated material, the polyfluoroalkyl phosphoric acid diesters, in human sera, wastewater treatment plant sludge, and paper fibers. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4589-4594.
- Dreyer, A., Matthias, V., Weinberg, I., Ebinghaus, R., 2010. Wet deposition of poly- and perfluorinated compounds in Northern Germany. *Environ. Pollut.* 158, 1221-1227.

E

- ECHA (European Chemical Agency), 2008. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment.
- ECHA (European Chemical Agency), 2012. Inclusion of substances of very high concern in the candidate list; ED/169/2012.
<http://echa.europa.eu/documents/10162/4ba9cac4-c00b-4e90-8d51-d8efdd1e0aef>

Accesible en Marzo 2017.

ECHA (European Chemical Agency), 2013. Inclusion of substances of very high concern in the candidate list; ED/69/2013.

<http://echa.europa.eu/documents/10162/b54352de-0f2f-454c-bc83-04f191c560b7>

Accesible en Marzo 2017.

ECHA (European Chemicals Agency), 2014. Annex XV Restriction Report - Proposal for a Restriction Substance: PFOA, PFOA salts and PFOA-related substances, (German and Norwegian competent authorities)

<http://echa.europa.eu/web/guest/registry-of-submitted-restriction-proposal-intentions>

Accesible en Marzo 2017.

ECHA (European Chemicals Agency), 2015. Inclusion of substances of very high concern in the Candidate List for eventual inclusion in Annex XIV; ED/79/2015.

<https://echa.europa.eu/candidate-list-table>

Accesible en Marzo 2017.

ECHA (European Chemical Agency), 2016a. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.16: Environmental exposure assessment. Version 3.0.

ECHA (European Chemical Agency), 2016b. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Part E: Risk characterisation. Version 3.0.

EFSA, 2008. Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. The European Food Safety Authority (EFSA) Journal 653, 1-131.

Ellis, D.A., Martin, J.W., Mabury, S.A., Hurley, M.D., Sulbaek Andersen, M.P., Wallington, T.J., 2003. Atmospheric lifetime of fluorotelomer alcohols. Environ. Sci. Technol. 37, 3816-3820.

Ellis, D.A., Martin, J.W., de Silva, A.O., Mabury, S.A., Hurley, M.D., Sulbaek Andersen, M.P., Wallington, T.J., 2004. Degradation of fluorotelomer alcohols: a likely atmospheric source of perfluorinated carboxylic acids. Environ. Sci. Technol. 38, 3316-3321.

Environment Canada, 2012. Screening assessment report perfluorooctanoic acid, its salts, and its precursors.

Ericson, I., Nadal, M., van Bavel, B., Lindstrom, G., Domingo, J.L., 2008. Levels of perfluorochemicals in water samples from Catalonia, Spain: is drinking water a

- significant contribution to human exposure?. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 614-619.
- Eschauzier, C., Raat, K.J., Stuyfzand, P.J., de Voogt, P., 2013. Perfluorinated alkylated acids in groundwater and drinking water: Identification, origin and mobility. *Sci. Total Environ.* 458-460, 477-485.
- Esteban, L., 1993. *La espectrometría de masas en imágenes*. ACKEditores.
- European Economic Community, 1986. Council Directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture (86/278/EEC). *Official Journal of the European Communities* N° L 181/6-12, Brussels.
- European Economic Community, 1991. Council Directive of 12 December 1991 concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources (91/676/EEC). *Official Journal of the European Communities* N° L 375/1-8, Brussels.
- European Commission, 2001. Working document of biological treatment of biowaste (2nd draft). DG ENV.A.2/LM/biowaste/2nd draft.
- European Commission, 2010. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. Final Report - Part I: Overview Report, Report by Milieu Ltd WRc and RPA for the European Commission, DG Environment under Study Contract DG ENV.G.4/ETU/2008/0076r.
- European Community, 2005. Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the regions. Taking sustainable use of resources forward: A thematic strategy on the prevention and recycling of waste. Brussels. COM(2005) 666 final.
- European Community, 2006. Directive 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council of the 12 December 2006 amending for the 30th time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (perfluorooctane sulfonates). *Official Journal of the European Union* N° L372/32-34, Brussels.
- European Community, 2009. Commission Regulation (EC) No 552/2009 of 22 June 2009 amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of

Chemicals (REACH) as regards Annex XVII. Official Journal of the European Union N° L164/7-30, Brussels.

European Union, 2000. Working document on sludge, 3rd draft, Brussels.

Eurostat, 2015. Sewage sludge production and disposal from urban wastewater. <http://ec.europa.eu/eurostat>. Accesible en Marzo 2017.

F

Felizeter, S., McLachlan, M.S., de Voogt, P., 2012. Uptake of perfluorinated alkyl acids by hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa*). Environ. Sci. Technol. 46, 11735-11743.

Felizeter, S., McLachlan, M.S., de Voogt, P., 2014. Root uptake and translocation of perfluorinated alkyl acids by three hydroponically grown crops. J. Agric. Food Chem. 62, 3334-3342.

Fernández, C., Alonso, C., Babín, M.M., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V., 2004. Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems. Sci. Total Environ. 323, 63-69.

G

Gebbink, W.A., Letcher, R.J., Hebert, C.E., Weseloh, D.V., 2011. Twenty years of temporal change in perfluoroalkyl sulfonate and carboxylate contaminants in herring gull eggs from the Laurentian Great Lakes. J. Environ. Monit. 13, 3365-3372.

Gewurtz S.B., de Silva, A.O., Backus, S.M., McGoldrick, D.J., Keir, M.J., Small, J., Melymuk, L., Muir, D.C.G., 2012. Perfluoroalkyl contaminants in Lake Ontario Lake Trout: Detailed examination of current status and long-term trends. Environ. Sci. Technol. 46, 5842-5850.

Giesy, J.P., Kannan, K., 2001. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. Environ. Sci. Technol. 35, 1339-1342.

Giesy, J.P., Kannan, K., 2002. Perfluorochemical surfactants in the environment. Environ. Sci. Technol. 36, 146A-152A.

Gilliland, F.D., Mandel, J.S., 1993. Mortality among employees of a perfluorooctanoic acid production plant. J. Occup. Med. 35, 950-954.

- Gilliland, F.D., Mandel, J.S., 1996. Serum perfluorooctanoic acid and hepatic enzymes, lipoproteins, and cholesterol: a study of occupationally exposed men. *Am. J. Ind. Med.* 29, 560-568.
- Glynn, A., Berger, U., Bignert, A., Ullah, S., Aune, M., Lignell, S., Darnerud, P.O., 2012. Perfluorinated alkyl acids in blood serum from primiparous women in Sweden: serial sampling during pregnancy and nursing, and temporal trends 1996-2010. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9071-9079.
- Gustafson, D.I., 1989. Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 339-357.
- Grümping, R., Stegemann, D., Homburg, B., Petersen, M., Opel, M., 2007. Occurrence of perfluorinated chemicals (PFCs) in the sewage system of a large German city, *Organohalogen Comp.* 69, 2896-2899.

H

- Harada, K.H., Yang, H.R., Moon, C.S., Hung, N.N., Hitomi, T., Inoue, K., Niisoe, T., Watanabe T., Kamiyama S., Takenaka K., Kim MY, Watanabe K., Takasuga T., Koizumi A., 2010. Levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in female serum samples from Japan in 2008, Korea in 1994-2008 and Vietnam in 2007-2008. *Chemosphere* 79, 314-319.
- Hekster, F.M., Pijnenburg, A.M.C.M., Laane, R.W.P.M., de Voogt, P., 2002. Perfluoroalkylated substances: aquatic environmental assessment. RIKZ report 2002. Ministry of Transport and Public Works, Institute for Coastal and Marine Management, The Hague, The Netherlands.
- Hess, P., de Boer, J., Cofino, W.P., Leonards P.E.G., Wells, D.E., 1995. Critical review of the analysis of non- and mono-ortho-chlorobiphenyls. *J. Chromatogr. A.* 703, 417-465.
- Higgins, C.P., Field, J.A., Criddle, C.S., Luthy, R.G., 2005. Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3946-3956.
- Higgins, C.P., Luthy, R.G., 2006. Sorption of perfluorinated surfactants on sediments. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7251-7256.
- Houde, M., Bujas, T.A.D., Small, J., Wells, R. S., Fair, P. A., Bossart, G. D., Solomon, K. R., Muir, D.C.G., 2006a. Biomagnification of perfluoroalkyl compounds in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) food web. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4138-4144.

- Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2006b. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3463-3476.
- Houde, M., Czub, G., Small, J.M., Backus, S., Wang, X., Alaee, M., Muir, D.C.G., 2008. Fractionation and bioaccumulation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) isomers in a Lake Ontario food web. *Environ. Sci. Technol.* 42, 9397-9403.
- Houde, M., de Silva, A.O., Muir, D.C.G., Letcher, R.J., 2011. Monitoring of perfluorinated compounds in aquatic biota: an updated review. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7962-7973.
- Houtz, E.F., Higgins, C.P., Field, J.A., Sedlak, D.L., 2013. Persistence of perfluoroalkyl acid precursors in AFFF-impacted groundwater and soil. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8187-8195.
- Huang, H., Zhang, S., Christie, P., 2011. Plant uptake and dissipation of PBDEs in the soils of electronic waste recycling sites. *Environ. Pollut.* 159, 238-243.
- Hurley, M.D., Wallington, T.J., Sulbaek Andersen, M.P., Ellis, D.A., Martin, J.W., Mabury, S.A., 2004. Atmospheric chemistry of fluorinated alcohols: reaction with Cl Atoms and OH radicals and atmospheric lifetimes. *J. Phys. Chem. A*, 108, 1973-1979.

I

- Iglesias, E., Pérez-García, V., 1989. Evaluation of city refuse compost maturity. A review. *Biological Wastes*, 27: 115-142.

J

- Jager, T., van der Wal, L., Fleuren, R.H.L.J., Barendregt, A., Hermens, J.L.M., 2005. Bioaccumulation of organic chemicals in contaminated soils: evaluation of bioassays with earthworms. *Environ. Sci. Technol.* 39, 293-298.
- Jahnke, A., Berger, U., 2009. Trace analysis of per- and polyfluorinated in various matrices-How do current methods perform?. *J. Chromatogr. A* 1216, 410-421.
- Jin, Y.H., Liu, W., Sato, I., Nakayama, S.F., Sasaki, K., Saito, N., Tsuda, S., 2009. PFOS and PFOA in environmental and tap water in China. *Chemosphere* 77, 605-611.

K

- Kannan, K., Koistinen, J., Beckmen, K., Evans, T., Gorzelany, J.F., Hansen, K.J., Jones, P.D., Helle, E., Nyman, M., Giesy, J.P., 2001a. Accumulation of perfluorooctane sulfonate in marine mammals. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1593-1598.
- Kannan, K., Franson, J.C., Bowerman, W.W., Hansen, K.J., Jones, P.D., Giesy, J.P., 2001b. Perfluorooctane sulfonate in fish-eating water birds including bald eagles and albatrosses. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3065-3070.
- Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillmann, G., Kumar, K.S., Loganathan, B.G., Mohd, M.A., Olivero, J., van Wouwe, N., Yang, J.H., Aldous, K.M., 2004. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4489-4495.
- Kannan, K., Tao, L., Sinclair, E., Pastva, S.D., Jude, D.J., Giesy, J.P., 2005. Perfluorinated compounds in aquatic organisms at various trophic levels in a Great Lake food chain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 559-566.
- Kannan, K., 2011. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances: current and future perspectives. *Environ. Chem.* 8, 333-338.
- Kato, K., Wong, L.Y., Jia, L.T., Kuklenyik, Z., Calafat, A.M., 2011. Trends in exposure to polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. Population: 1999-2008. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8037-8045.
- Key, B.D., Howell, R.D., Criddle, C.S., 1997. Fluorinated organics in the biosphere. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2445-2454.
- Kinney, C.A., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Burkhardt, M.R., Werner, S.L., Cahill, J.D., 2006. Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7207-7215.
- Kirchgeorg, T., Dreyer, A., Gabrieli, J., Kehrwald, N., Sigl, M., Schwikowski, M., Boutron, C., Gambaro, A., Barbante, C., Ebinghaus, R., 2013. Temporal variations of perfluoroalkyl substances and polybrominated diphenyl ethers in alpine snow. *Environ. Pollut.* 178, 367-374.
- Kissa, E., 2001. Fluorinated surfactants and repellents. 2nd edn. Marcel Dekker, New York.
- Krippner, J., Brunn, H., Falk, S., Georgii, S., Schubert, S., Stahl, T., 2014. Effects of chain length and pH on the uptake and distribution of perfluoroalkyl substances in maize (*Zea mays*). *Chemosphere* 94, 85-90.

L

- Labadie, P., Chevreuil, M., 2011. Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). *Environ. Pollut.* 159, 391-397.
- Lange, F.T., Wenz, M., Schmidt, C.K., Brauch, H.J., 2007. Occurrence of perfluoroalkyl sulfonates and carboxylates in German drinking water sources compared to other countries. *Water Sci. Technol.* 56, 151-158.
- Langlois, I., Berger, U., Zencak, Z., Oehme, M., 2007. Mass spectral studies of perfluorooctane sulfonate derivatives separated by high-resolution gas chromatography. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 3547-3553.
- Lasier, P.J., Washington, J.W., Hassan, S.M., Jenkins, T.M., 2011. Perfluorinated chemicals in surface waters and sediments from the Conasauga, Oostanaula, and Coosa rivers and their bioaccumulation in the aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2194-2201.
- Laskowski, D.A., Goring, C.A.I., McCall, P.J., Swann, R.L., 1982. Terrestrial environment. *Environment Risk Analysis for Chemicals*, R.A. Conway (Ed.), Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp. 198-240.
- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., Seed, J., 2007. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci.* 99, 366-394.
- Lechner, M., Knapp, H., 2011. Carryover of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) from soil to plant and distribution to the different plant compartments studied in cultures of carrots (*Daucus carota ssp. Sativus*), potatoes (*Solanum tuberosum*), and cucumbers (*Cucumis Sativus*). *J. Agric. Food Chem.* 59, 11011-11018.
- Letcher, R.J., Sub, G., Moore, J.N., Williams, L.L., Martin, P.A., de Solla, S.R., Bowerman, W.W., 2015. Perfluorinated sulfonate and carboxylate compounds and precursors in herring gull eggs from across the Laurentian Great Lakes of North America: Temporal and recent spatial comparisons and exposure implications. *Sci. Total Environ.* 538, 468-477.
- Lindström, G., Kärman, A., van Bavel, B., 2009. Accuracy and precision in the determination of perfluorinated chemicals in human blood verified by interlaboratory comparisons. *J. Chromatogr. A* 1216, 394-400.

- Lindstrom, A.B., Strynar, M.J., Delinsky, A.D., Nakayama, S.F., McMillan, L., Libelo, E.L., Neill, M., Thomas, L., 2011. Application of WWTP biosolids and resulting perfluorinated compound contamination of surface and well water in Decatur, Alabama, USA. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8015-8021.
- Liu, C., Gin, K.Y.H., Chang, V.W.C., Goh, B.P.L., Reinhard, M., 2011. Novel perspectives on the bioaccumulation of PFCs - the concentration dependency. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9758-9764.
- Llorca, M., Farré, M., Picó, Y., Barceló, D., 2011. Analysis of perfluorinated compounds in sewage sludge by pressurized solvent extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218, 4840-4846.
- Loewen, M., Halldorson, T., Wang, F., Tomy, G., 2005. Fluorotelomer carboxylic acids and PFOS in rainwater from an urban center in Canada. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2944-2951.
- Loganathan, B.G., Sajwan, K.S., Sinclair, E., Kumar, K.S., Kannan, K., 2007. Perfluoroalkyl sulfonates and perfluorocarboxylates in two wastewater treatment facilities in Kentucky and Georgia. *Wat. Res.* 41, 4611-4620.
- Loi, E.I.H., Leo, W.Y.Y., Taniyasu, S., Lam, P.K.S., Kannan, K., Yamashita, N., 2011. Trophic magnification of poly- and perfluorinated compounds in a subtropical food web. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5506-5513.
- Loi, E.I.H., Yeung, L.W.Y., Mabury, S.A., Lam, P.K.S., 2013. Detections of commercial fluorosurfactants in Hong Kong marine environment and human blood: a pilot study. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4677-4685.

M

- Malinsky, M.D., Jacoby, C.B., Reagen, W.K., 2011. Determination of perfluorinated compounds in fish fillet homogenates: method validation and application to fillet homogenates from the Mississippi River. *Anal. Chim. Acta* 683, 248-257.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), 1990. Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino), 2009. Caracterización de los lodos de depuradoras generados en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

- Martin, J.W., Muir, D.C., Moody, C.A., Ellis, D.A., Kwan, W.C., Solomon, K.R., Mabury, S.A., 2002. Collection of airborne fluorinated organics and analysis by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 584-590.
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003a. Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 196-204.
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003b. Dietary accumulation of perfluorinated acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 189-195.
- Martin, J.W., Smithwick, M.M., Braune, B.M., Hoekstra, P.F., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004a. Identification of long-chain perfluorinated acids in biota from the Canadian Arctic. *Environ. Sci. Technol.* 38, 373-380.
- Martin, J.W., Kannan, K., Berger, U., de Voogt, P., Field, J., Franklin, J., Giesy, J., Harner, T., Muir, D., Scott, B., Kaiser, M., Jarnsberg, U., Jones, K., Mabury, S., Schroeder, H., Simcik, M., Sottani, C., van Bavel, B., Karrman, A., Lindstrom, G., van Leeuwen, S., 2004b. Analytical challenges hamper perfluoroalkyl research. *Environ Sci Technol* 38, 248A-255A.
- Martin, J.W., Whittle, D.M., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004c. Perfluorinated contaminants in a food web from Lake Ontario. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5379-5385.
- Martin, J.W., Asher, B.J., Beesoon, S., Benskin, J.P., Ross, M.S., 2010. PFOS or PreFOS? Are perfluorooctane sulfonate precursors (PreFOS) important determinants of human and environmental perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure?. *J. Environ. Monit.* 12, 1979-2004.
- Martínez-Moral, M.P., Tena, M.T., 2013. Focused ultrasound solid-liquid extraction of perfluorinated compounds from sewage sludge. *Talanta* 109, 197-202.
- McKone, T.E., Maddalena, R.L., 2007. Plant uptake of organic pollutants from soil: bioconcentration estimates based on models and experiments. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 2494-2504.
- Milinovic, J., Lacorte, S., Vidal, M., Rigol, A., 2015. Sorption behaviour of perfluoroalkyl substances in soils. *Sci. Total Environ.* 511, 63-71.
- Milinovic, J., Lacorte, S., Rigol, A., Vidal, M., 2016. Sorption of perfluoroalkyl substances in sewage sludge. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8339-8348.

- Möller, A., Ahrens, L., Surm, R., Westerveld, J., van der Wielen, F., Ebinghaus, R., de Voogt, P., 2010. Distribution and sources of polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the River Rhine watershed. *Environ. Pollut.* 158, 3243-3250.
- Moody, C.A., Kwan, W.C., Martin, J.W., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2001. Determination of perfluorinated surfactants in surface water samples by two independent analytical techniques: Liquid chromatography/ tandem mass spectrometry and ^{19}F NMR. *Anal. Chem.* 73, 2200-2206.
- Moody, C.A., Hebert, G.N., Strauss, S.H., Field, J.A., 2003. Occurrence and persistence of perfluorooctanesulfonate and other perfluorinated surfactants in groundwater at a fire-training area at Wurtsmith Air Force Base, Michigan, USA. *J. Environ. Monit.*, 5, 341-345.
- Müller, C.E., de Silva, A.O., Small, J., Williamson, M., Wang, X., Morris, A., Katz, S., Gamberg, M., Muir, D.C.G., 2011. Biomagnification of perfluorinated compounds in a remote terrestrial food chain: Lichen Caribou Wolf. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8665-8673.

N

- Nakata, H., Kannan, K., Nasu, T., Cho, H., Sinclair, E., Takemura, A., 2006. Perfluorinated contaminants in sediments and aquatic organisms collected from shallow water and tidal flat areas of the Ariake Sea, Japan: environmental fate of perfluorooctane sulfonate in aquatic ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4916-4921.
- Navarro, I., Sanz, P., Martínez, M.A., 2011. Analysis of perfluorinated alkyl substances in Spanish sewage sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1277-1286.
- Navarro, I., de la Torre, A., Sanz, P., Pro, J., Carbonell, G., Martínez, M.A., 2016. Bioaccumulation of emerging organic compounds (perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants) by earthworm in biosolid amended soils. *Environ. Res.* 149, 32-39.
- Navarro, I., de la Torre, A., Sanz, P., Porcel, M.A., Pro, J., Carbonell, G., Martínez, M.A., 2017. Uptake of perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants by crop plants grown in biosolids-amended soils. *Environ. Res.* 152, 199-206.

O

- OECD, 2002. Hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts. ENV/JM/RD(2002)17/Final.
- OECD, 2015. Working towards a global emission inventory of PFASs: focus on PFCAs-*status quo* and the way forward. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on risk management N° 30.
- Okada, E., Kashino, I., Matsuura, H., Sasaki, S., Miyashita, C., Yamamoto, J., Ikeno, T., Ito, Y.M., Matsumura, T., Tamakoshi, A., Kishi, R., 2013. Temporal trends of perfluoroalkyl acids in plasma samples of pregnant women in Hokkaido, Japan, 2003-2011. *Environ. Inter.* 60, 89-96.
- Olsen, G.W., Chang, S., Noker, P.E., Gorman, G.S., Ehresman, D.J., Lieder, P.H., Butenhoff, J.L., 2009. A comparison of the pharmacokinetics of perfluorobutanesulfonate (PFBS) in rats, monkeys, and humans. *Toxicology* 256, 65-74.
- Olsen, G.W., Ellefson, M.E., Mair, D.C., Church, T.R., Goldberg, C.L., Herron, R.M., Medhdizadehkashi, Z., Nobiletti, J.B., Rios, J.A., Reagen, W.K., Zobel, L.R., 2011. Analysis of a homologous series of perfluorocarboxylates from American Red Cross adult blood donors, 2000-2001 and 2006. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8022-8029.
- OSPAR Commission, 2005 (2006 Update). Hazardous substances series, perfluorooctane sulphonate (PFOS).
- OSPAR Commission, 2011. Review statement for the OSPAR background document on perfluorooctane sulphonate.

P

- Papa, E., Castiglioni, S., Gramatica, P., Nikolayenko, V., Kayumov, O., Calamaria, D., 2004. Screening the leaching tendency of pesticides applied in the Amu Darya Basin (Uzbekistan), *Water Res.* 38, 3485-3494.
- Paul, A.G., Jones, K.C., Sweetman, A.J., 2009. A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate. *Environ. Sci. Technol.* 43, 386-392.
- Perkola, N., Sainio, P., 2013. Survey of perfluorinated alkyl acids in Finnish effluents, storm water, landfill leachate and sludge. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 7979-7987.

- Petersen, M., Opel, M., Neugebauer, F., Paepke, O., 2009. Perfluorinated compounds in sewage sludge samples from Germany, collected in 2009. *Organohalogen Comp* 71, 2095-2097.
- Pistocchi, A., Loos, R., 2009. A map of European emissions and concentrations of PFOS and PFOA. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9237-9244.
- POPRC, 2008. Consideration of new information on perfluorooctane sulfonate (PFOS); UNEP/POPS/POPRC.4/INF/17, Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.
- POPRC, 2015. Pentadecafluorooctanoic acid (CAS No: 335-67-1, PFOA, perfluorooctanoic acid), its salts and PFOA-related compounds. UNEP/POPS/POPRC.11/POPRC-11/4, Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.
- Powley, C.R., George, S.W., Ryan, T.W., Buck, R.C., 2005. Matrix effect-free analytical methods for determination of perfluorinated carboxylic acids in environmental matrixes. *Anal. Chem.* 77, 6353-6358.
- Powley, C.R., George, S.W., Russell, M.H., Hoke, R.A., Buck, R.C., 2008. Polyfluorinated chemicals in a spatially and temporally integrated food web in the Western Arctic. *Chemosphere* 70, 664-672.
- Prevedouros, K., Cousins, I.T., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H., 2006. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environ. Sci. Technol.* 40, 32-44.

R

- Reiner, J.L., Phinney, K.W., Keller, J.M., 2011a. Determination of perfluorinated compounds in human plasma and serum standard reference materials using independent analytical methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 2899-2907.
- Reiner, J.L., O'Connell, S.G., Moors, A.J., Kucklick, J.R., Becker, P.R., Keller, J.M., 2011b. Spatial and temporal trends of perfluorinated compounds in Beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from Alaska. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8129-8136.
- Reiner, J.L., Blaine, A.C., Higgins, C.P., Huset, C., Jenkins, T.M., Kwadijk, C.J.A.F., Lange, C.C., Muir, D.C.G., Reagen, W.K., Rich, C., Small, J.M., Strynar, M.J., Washington, J.W., Yoo, H., Keller J.M., 2015. Polyfluorinated substances in abiotic standard reference materials. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 2975-2983.

- Renner, R., 2006. The long and the short of perfluorinated replacements. *Environ. Sci. Technol.* 40, 12-13.
- Rigét, F., Bossi, R., Sonne, C., Vorkamp, K., Dietz, R., 2013. Trends of perfluorochemicals in Greenland ringed seals and polar bears: Indications of shifts to decreasing trends. *Chemosphere* 93, 1607-1614.
- Roig, N., Sierra, J., Nadal, M., Martí, E., Navalón-Madrigal, P., Schuhmacher, M., Domingo J.L., 2012. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 425, 99-109.
- Roos, A., Berger, U., Järnberg, U., van Dijk, J., Bignert, A., 2013. Increasing concentrations of perfluoroalkyl acids in Scandinavian otters (*Lutra lutra*) between 1972 and 2011: A new threat to the otter population?. *Environ. Sci. Technol.* 47, 11757-11765.
- Rüdel, H., Müller, J., Jüriling, H., Bartel-Steinbach, M., Koschorreck, J., 2011. Survey of patterns, levels, and trends of perfluorinated compounds in aquatic organisms and bird eggs from representative German ecosystems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 1457-1470.
- Ruisheng, Y., 2008. Ministry of Environmental Protection of China. Preliminary information on risk management evaluation of PFOS's in China.
http://chm.pops.int/portals/0/repository/comments_draftRME2008/UNEP-POPS-POPRC-DRME-08-CHI-SCCP.english.pdf
Accesible en Marzo 2017.
- Ruowei, M., Kaimin, S., 2010. Perfluorochemicals in wastewater treatment plants and sediments in Hong Kong. *Environ. Poll.* 158, 1354-1362.

S

- Sabourin, L., Beck, A., Duenk, P.W., Kleywegt, S., Lapen, D.R., Li, H., Metcalfe, C.D., Payne, M., Topp, E., 2009. Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of dewatered municipal biosolids to an agricultural field. *Sci. Total Environ.* 407, 4596-4604.
- Scheringer, M., Trier, X., Cousins, I.T., de Voogt, P., Fletcher, T., Wang, Z., Webster, T.F., 2014. Helsingør Statement on poly- and perfluorinated alkyl substances (PFASs). *Chemosphere* 114, 337-339.
- Schröder, H.F., 2003. Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with mass spectrometry and

- tandem mass spectrometry after pressurised liquid extraction and separation on fluorine-modified reversed-phase sorbents. *J. Chromatogr. A.* 1020, 131-151.
- Schultz, M.M., Higgins, C.P., Huset, C.A., Luthy, R.G., Barofsky, D.F., Field, J.A., 2006. Fluorochemical mass flows in a municipal wastewater treatment facility. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7350-7357.
- Scott, B.F., Moody, C.A, Spencer, C., Small, J.M., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2006. Analysis for perfluorocarboxylic acids/anions in surface waters and precipitation using GC-MS and analysis of PFOA from large-volume samples. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6405-6410.
- Sellström, U., de Wit, C.A., Lundgren, L., Tysklind, M., 2005. Effect of sewage-sludge application on concentrations of higher-brominated diphenyl ethers in soils and earthworms. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9064-9070.
- Sepulvado, J.G., Blaine, A.C., Hundal, L.S., Higgins, C.P., 2011. Occurrence and fate of perfluorochemicals in soil following the land application of municipal biosolids. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8106-8112.
- SFT (Norwegian Pollution Control Authority), 2008. Screening of polyfluorinated organic compounds at four fire training facilities in Norway (TA- 2444/2008).
- Shivakoti, B.R., Tanaka, S., Fujii, S., Kunacheva, C., Boontanon, S.K., Musirat, C., Seneviratne, S.T.M.L.D., Tanaka, H., 2010. Occurrences and behavior of perfluorinated compounds (PFCs) in several wastewater treatment plants (WWTPs) in Japan and Thailand. *J. Environ. Monit.*, 12, 1255-1264.
- Shoeib, M., Harner, T., Vlahos, P., 2006. Perfluorinated chemicals in the Arctic atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7577-7583.
- Sijm, D., Kraaij, R., Belfroid, A., 2000. Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environ. Pollut.* 108, 113-119.
- Simcik, M.F., Dorweiler, K.J., 2005. Ratio of perfluorochemical concentrations as a tracer of atmospheric deposition to surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8678-8683.
- Sinclair, E., Kannan, K., 2006a. Mass loading and fate of perfluoroalkyl surfactants in wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1408-1414.
- Sinclair, E., Mayack, D.T., Roblee, K., Yamashita, N., Kannan, K., 2006b. Occurrence of perfluoroalkyl surfactants in water, fish, and birds from New York State. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 398-410.

- Singh, R.P., Agrawal, M., 2008. Potencial beneficts and risks of land application of sewage sludge. *Waste Manage.* 28, 347-358.
- Skuladottir, M., Ramel, A., Rytter, D., Haug, L.S., Sabaredzovic, A., Bech, B.H., Henriksen, T.B., Olsen, S.F., Halldorsson, T.I., 2015. Examining confounding by diet in the association between perfluoroalkyl acids and serum cholesterol in pregnancy. *Environ. Res.* 143, 33-38.
- Sottani, C., Minola, C., 2002. Quantitative determination of perfluorooctanoic acid ammonium salt in human serum by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 650-654.
- Statutory Instruments Act, 2008. Regulations adding perfluorooctane sulfonate and its salts to the Virtual Elimination List, SOR/DORS/2009-15. *Can. Gazette* 142, 2587-2590.
- Stahl, T., Riebe R.A., Falk, S., Failing, K., Brunn, H., 2013. Long-term lysimeter experiment to investigate the leaching of perfluoroalkyl substances (PFASs) and the carry-over from soil to plants: results of a pilot study. *J. Agric. Food Chem.* 61, 1784-1793.
- Stemmler, I., Lammel, G., 2010. Pathways of PFOA to the Arctic: variabilities and contributions of oceanic currents and atmospheric transport and chemistry sources. *Atmos. Chem. Phys.* 10, 9965-9980.
- Stock, N.L., Lau, F.K., Ellis, D.A., Martin, J.W., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004. Polyfluorinated telomer alcohols and sulfonamides in the North American Troposphere. *Environ. Sci. Technol.* 38, 991-996.
- Stock, N.L., Furdui, V.I., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2007. Perfluoroalkyl contaminants in the Canadian Arctic: Evidence of atmospheric transport and local contamination. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 3529-3536.
- Sun, H., Li, F., Zhang, T., Zhang, X., He, N., Song, Q., Zhao, L., Sun, L., Sun, T., 2011a. Perfluorinated compounds in surface waters and WWTPs in Shenyang, China: Mass flows and source analysis. *Water Res.* 45, 4483-4490.
- Sun, H., Gerecke, A.C., Giger, W., Alder, A.C., 2011b. Long-chain perfluorinated chemicals in digested sewage sludges in Switzerland. *Environ. Pollut.* 159, 654-662.

T

- Tang, H., Xiang, Q., Lei, M., Yan, J., Zhu, L., Zou, J., 2012. Efficient degradation of perfluorooctanoic acid by UV–Fenton process. *Chem. Eng. J.* 184, 156-162.
- Tao, L., Kannan, K., Kajiwar, N., Costa, M.M., Fillmann, G., Takahashi, S., Tanabe, S., 2006. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in albatrosses, elephant seals, penguins, and polar skuas from the Southern Ocean. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 7642-7648.
- Thompson, M., Wood, R., 1993. The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. *Pure & Appl. Chem.* 65, 2123-2144.
- Trufelli, H., Palma, P., Famiglini, G., Cappiello, A., 2011. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 30, 491-509.

U

- UBA (German Federal Environmental Agency), 2009. Do without per- and poly-fluorinated chemicals and prevent their discharge into the environment. German use of fertilizers Ordinance 1–17.
- UNEP, 2006. Sulfonato de perfluorooctano: Perfil de riesgos. Informe del Comité de Examen de los Contaminantes Orgánicos Persistentes sobre la labor realizada en su segunda reunión, UNEP/POPS/POPRC.2/17/Add.5.
- UNEP, 2015a. Propuesta de inclusión del ácido pentadecafluorooctanoico (PFOA, ácido perfluorooctanoico), sus sales y los compuestos relacionados con el PFOA en los anexos A, B o C del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Informe del Comité de Examen de los Contaminantes Orgánicos Persistentes sobre la labor realizada en su undécima reunión, UNEP/POPS/POPRC.11/5.
- UNEP, 2015b. Revised draft guidance for the inventory of perfluorooctane sulfonic acid and related chemicals listed under the Stockholm Convention. Conference of the Parties to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Seventh meeting, UNEP/POPS/COP.7/INF/26.
- USEPA, 2002. Perfluoroalkyl sulfonates; Significant new use rule. *Fed. Regist* 67, 72854-72867.
- USEPA, 2005. Draft risk assessment of the potential human health effects associated with exposure to perfluorooctanoic acid and its salts. U.S. Environmental

Protection Agency, Office of Pollution Prevention and Toxics Risk Assessment Division.

USEPA, 2006. 2010/15 PFOA Stewardship Program. Guidance on reporting emissions and product content. U.S. Environmental Protection Agency.

V

Valsecchi, S., Rusconi, M., Polesello, S., 2013. Determination of perfluorinated compounds in aquatic organisms: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 405,143-157.

van de Vijver, K.I., Holsbeek, L., Das, K., Blust, R., Joiris, C., de Coen, W., 2007. Occurrence of perfluorooctane sulfonate and other perfluorinated alkylated substances in harbor porpoises from the Black Sea. *Environ. Sci. Technol.* 41, 315-320.

van Leeuwen, S.P.J., Kärman, A., van Bavel, B., de Boer, J., Lindström, G., 2006. Struggle for quality in determination of perfluorinated contaminants in environmental and human samples. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7854-7860.

Venkatesan, A.K., Halden, R.U., 2013. National inventory of perfluoroalkyl substances in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA National Sewage Sludge Survey. *J. Hazard. Mater.* 252- 253, 413- 418.

Villagrasa, M., López de Alda, M., Barceló, D., 2006. Environmental analysis of fluorinated alkyl substances by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 953-972.

W

Wallington, T.J., Hurley, M.D., Xia, J., Wuebbles, D.J., Sillman, S., Ito, A., Penner, J.E., Ellis, D.A., Martin, J., Mabury, S.A., Nielsen, O.J., Sulbaek Andersen, M.P., 2006. Formation of C₇F₁₅COOH (PFOA) and other perfluorocarboxylic acids during the atmospheric oxidation of 8:2 fluorotelomer alcohol. *Environ. Sci. Technol.* 40, 924-930.

Walter, I., Cuevas, G., García, S., Martínez, F., 2000. Biosolid effects on soil and native plants production in a degraded semiarid ecosystem in central Spain. *Waste Manage. Res.* 18, 259-263.

Wang, T., Wang, Y., Liao, C., Cai, Y., Jiang, G., 2009. Perspectives on the inclusion of perfluorooctane sulfonate into the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 43, 5171-5175.

- Washington, J.W., Yoo, H., Ellington, J.J., Jenkins, T.M., Libelo, E.L., 2010. Concentrations, distribution and persistence of perfluoroalkylates in sludge-applied soils near Decatur, Alabama, USA. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8390-8396.
- Weinberg, I., Dreyer, A., Ebinghaus, R., 2011. Waste water treatment plants as sources of polyfluorinated compounds, polybrominated diphenyl ethers and musk fragrances to ambient air. *Environ. Pollut.* 159, 125-132.
- Weiss, J.M., van der Veen, I., van Leeuwen, S.P.J., Cofino, W., Crum, S., de Boer, J., 2013. Analytical improvements shown over four interlaboratory studies of perfluoroalkyl substances in environmental and food samples. *Trend. Anal. Chem.* 43, 204-216.
- Wen, B., Li, L., Zhang, H., Ma, Y., Shan, X-Q., Zhang, S., 2014. Field study on the uptake and translocation of perfluoroalkyl acids (PFAAs) by wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in biosolids-amended soils. *Environ. Pollut.* 184, 547-554.
- Wen, B., Zhang, H., Li, L., Hu, X., Shan, X., Zhang, S., 2015. Bioavailability of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in biosolids-amended soils to earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere* 118, 361-366.
- Wilson, S.C., Duarte-Davidson, R., Jones, K.C., 1996. Screening the environmental fate of organic contaminants in sewage sludges applied to agricultural soils: 1. The potential for downward movement to groundwaters, *Sci. Total Environ.* 185, 45-57.
- Woodcroft, M.W., Ellis, D.A., Rafferty, S.P., Burns, D.C., March, R.E., Stock, N.L., Trumpour, K.S., Yee, J., Munro, K., 2010. Experimental characterization of the mechanism of perfluorocarboxylic acids' liver protein bioaccumulation: The key role of the neutral species. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1669-1677.

Y

- Yamashita, N., Kannan, K., Taniyasu, S., Horii, Y., Okazawa, T., Petrick, G., Gamo, T., 2004. Analysis of perfluorinated acids at parts-per-quadrillion levels in seawater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5522-5528.
- Yamashita, N., Kannan, K., Taniyasu, S., Horii, Y., Petrick, G., Gamo, T., 2005. A global survey of perfluorinated acids in oceans. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 658-668.
- Yamashita, N., Taniyasu, S., Petrick, G., Wei, S., Gamo, T., Lam, P.K.S., Kannan, K., 2008. Perfluorinated acids as novel chemical tracers of global circulation of ocean waters. *Chemosphere* 70, 1247-1255.

- Yang, L., Zhu, L., Liu, Z., 2011. Occurrence and partition of perfluorinated compounds in water and sediment from Liao River and Taihu Lake, China. *Chemosphere* 83, 806-814.
- Yao, Y., Volchek, K., Brown, C.E., Robinson, A., Obal, T., 2014. Comparative study on adsorption of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) by different adsorbents in water. *Water Sci. Technol.* 70, 1983-1991.
- Yeung, L.W., Robinson, S.J., Koschorreck, J., Mabury, S.A., 2013a. Part II. A temporal study of PFOS and its precursors in human plasma from two German cities in 1982-2009. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3875-3882.
- Yeung, L.W., Robinson, S.J., Koschorreck, J., Mabury, S.A., 2013b. Part I. A temporal study of PFCAs and their precursors in human plasma from two German cities 1982-2009. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3865-3874.
- Yoo, H., Washington, J.W., Jenkins, T.M., Ellington, J.J., 2011. Quantitative determination of perfluorochemicals and fluorotelomer alcohols in plants from biosolid-amended fields using LC/MS/MS and GC/MS. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7985-7990.

Z

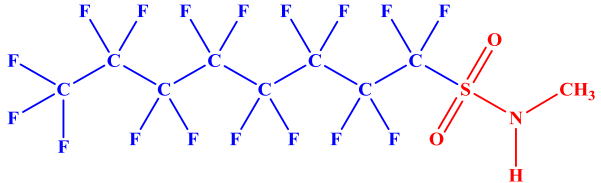
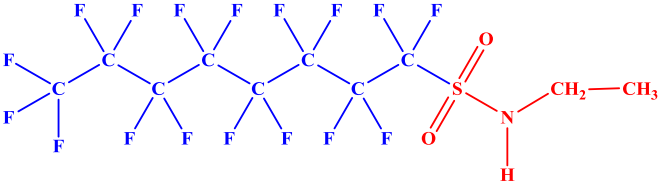
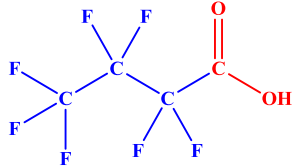
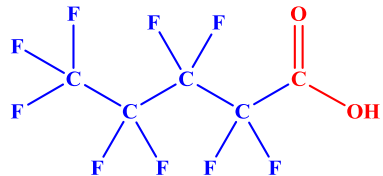
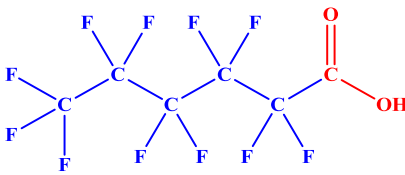
- Zareitalabad, P., Siemens, J., Hamer, M., Amelung, W., 2013. Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in surface waters, sediments, soils and wastewater - A review on concentrations and distribution coefficients. *Chemosphere* 91, 725-732.
- Zhao, S., Zhu, L., Liu, L., Liu, Z., Zhang, Y., 2013. Bioaccumulation of perfluoroalkyl carboxylates (PFCAs) and perfluoroalkane sulfonates (PFASs) by earthworms (*Eisenia fetida*) in soil. *Environ. Pollut.* 179, 45-52.
- Zhao, S., Fang, S., Zhu, L., Liu, L., Liu, Z., Zhang, Y., 2014. Mutual impacts of wheat (*Triticum aestivum* L.) and earthworms (*Eisenia fetida*) on the bioavailability of perfluoroalkyl substances (PFASs) in soil. *Environ. Pollut.* 184, 495-501.
- Zhou, Q., Deng, S., Zhang, Q., Fan, Q., Huang, J., Yu, G., 2010. Sorption of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate on activated sludge. *Chemosphere* 81, 453-458.

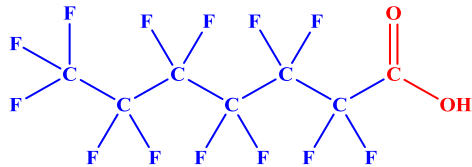
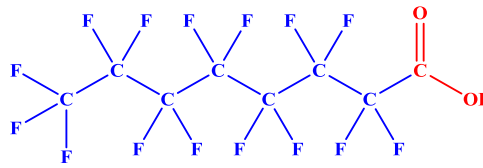
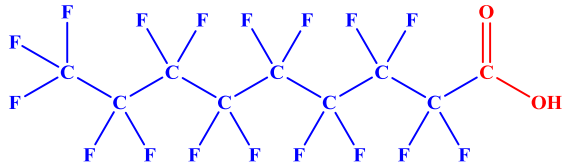
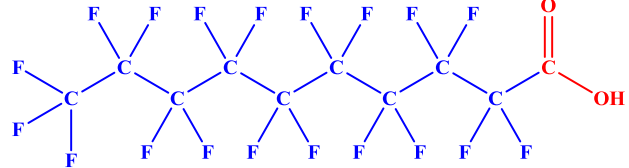
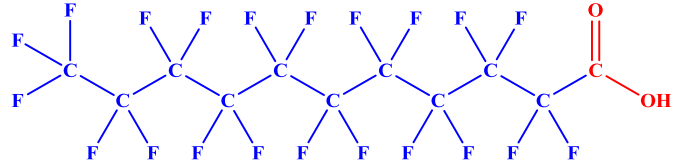
ANEXOS

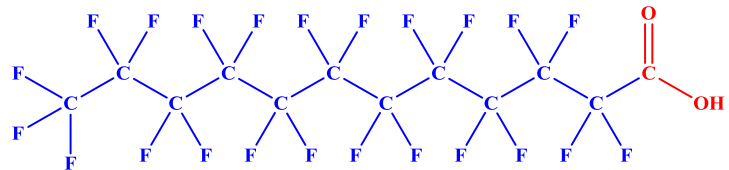
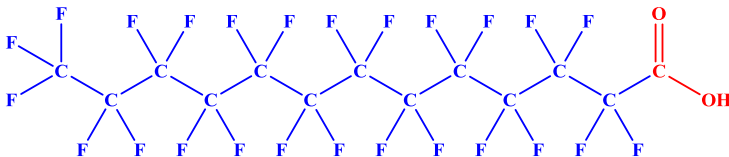
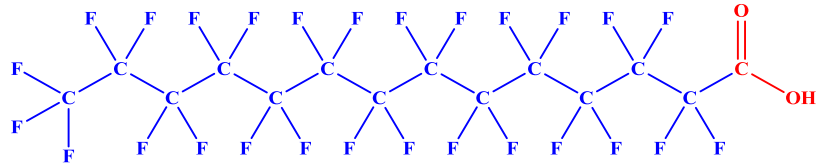
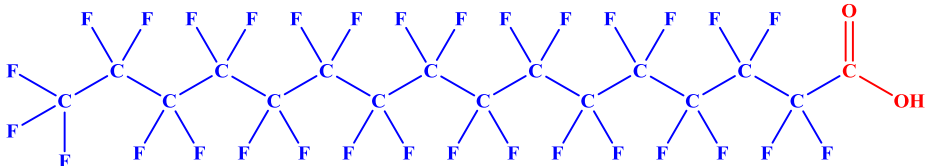
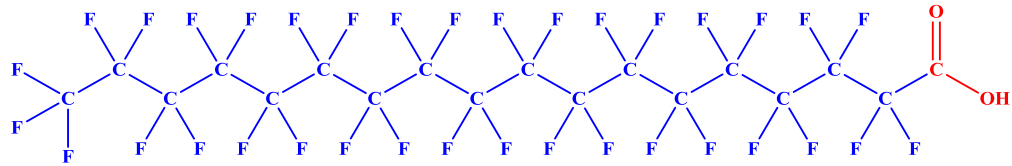
ANEXO I

Sustancias perfluoradas analizadas

COMPUESTO	CAS N°	FÓRMULA	ESTRUCTURA
Perfluorobutano sulfonato (PFBS)	29420-49-3	$C_4F_9SO_3^-$	
Perfluorohexano sulfonato (PFHxS)	307-24-4	$C_6F_{13}SO_3^-$	
Perfluorooctano sulfonato (PFOS)	2795-39-3 1763-23-1 (ácido)	$C_8F_{17}SO_3^-$	
Perfluorodecano sulfonato (PFDS)	335-77-3	$C_{10}F_{21}SO_3^-$	
Perfluorooctano sulfonamida (FOSA)	754-91-6	$C_8H_2F_{17}SO_2N$	

<i>N</i> -metil-perfluorooctano sulfonamida (<i>N</i> -MeFOSA)	31506-32-8	$C_9H_4F_{17}NO_2S$	
<i>N</i> -etil-perfluorooctano sulfonamida (<i>N</i> -EtFOSA)	4151-50-2	$C_{10}H_6F_{17}NO_2S$	
Ácido perfluorobutanoico (PFBA)	375-22-4	$C_4HF_7O_2$	
Ácido perfluoropentanoico (PFPeA)	2706-90-3	$C_5HF_9O_2$	
Ácido perfluorohexanoico (PFHxA)	68259-11-0	$C_6HF_{11}O_2$	

Ácido perfluoroheptanoico (PFHpA)	375-85-9	$C_7HF_{13}O_2$	
Ácido perfluorooctanoico (PFOA)	335-67-1	$C_8HF_{15}O_2$	
Ácido perfluorononanoico (PFNA)	375-95-1	$C_9HF_{17}O_2$	
Ácido perfluorodecanoico (PFDA)	335-76-2	$C_{10}HF_{19}O_2$	
Ácido perfluoroundecanoico (PFUdA)	2058-94-8	$C_{11}HF_{21}O_2$	

Ácido perfluorododecanoico (PFD _o A)	307-55-1	C ₁₂ HF ₂₃ O ₂	
Ácido perfluorotridecanoico (PFT _r A)	72629-94-8	C ₁₃ HF ₂₅ O ₂	
Ácido perfluorotetradecanoico (PFT _e A)	376-06-7	C ₁₄ HF ₂₇ O ₂	
Ácido perfluorohexadecanoico (PFH _x DA)	67905-19-5	C ₁₆ HF ₃₁ O ₂	
Ácido perfluorooctadecanoico (PFOD _A)	16517-11-6	C ₁₈ HF ₃₅ O ₂	

ANEXO II

Artículo I

“Analysis of perfluorinated alkyl substances in Spanish sewage sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry”.

Irene Navarro, Paloma Sanz, María de los Ángeles Martínez.

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2011) 400: 1277-1286.

Analysis of perfluorinated alkyl substances in Spanish sewage sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Irene Navarro · Paloma Sanz · María Ángeles Martínez

Received: 27 October 2010 / Revised: 21 December 2010 / Accepted: 2 January 2011 / Published online: 22 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The present article describes the development of an analytical method for the determination of 13 perfluorinated alkyl substances (PFAS), as well as its application to real sewage sludge samples to confirm the presence of these compounds. The isolation of the analytes was performed by agitation, sonication and centrifugation techniques, followed by EnviCarb cleanup and weak anion exchange solid-phase extraction. Sensitive and selective determination was carried out by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS). Six mass-labelled internal standards were used to ensure the accuracy of the analytical results following isotopic dilution method. Several mobile phases (acetonitrile, methanol, mixtures of both and water with ammonium acetate or acetic acid) have been tested to reach the best resolution and reproducibility results. Other parameters related to MS/MS conditions were optimized. The reliability of the method was confirmed by the evaluation of linearity ($R^2=0.995$ – 0.999), accuracy (84–99%) and injection repeatability and reproducibility (relative standard deviation below 19 and 23%, respectively). Limits of detection ranged from 0.007 to 2.217 pg. Recoveries show values higher than 80% for most of the target compounds. The application of this method to twenty real samples

demonstrates its efficiency and accuracy, as well as provides for the first time to our knowledge, PFAS levels in sewage sludges from Spain.

Keywords Perfluorinated alkyl substances (PFAS) · PFOS · PFOA · HPLC–MS/MS · Sewage sludge

Introduction

Perfluorinated alkyl substances (PFAS) have been manufactured for over 50 years. These chemicals have been used as surface protectors in numerous industrial and consumer applications, including coatings for furniture, clothing and carpets and some are active ingredients in cosmetics, household cleaners, firefighting foams and packaged food containers [1]. Due to their chemical structure, these substances are resistant to hydrolysis, photolysis, biodegradation and metabolism, characteristics making them environmentally persistent, bioaccumulative and potentially harmful [2–4]. Several studies in biota [5, 6], air [7], sediments [8] and water [9] demonstrate that these compounds are globally distributed in the environment.

Perfluorinated compounds found in the environment are anthropogenic [3], mainly as a result of human manufacture and use. Release into the environment can occur at each stage of the fluorochemical product's life cycle. They can be released during the synthesis, the incorporation into the product, the distribution of the product to the users, the use of the product by consumers and the disposal [10]. After their utilization, these fluorinated surfactants can reach the aquatic systems either by release into rivers or via wastewater discharge into receiving waters. Although PFAS are considered highly mobile in aqueous phase, significant detection in activated sludge could suggest preferential

Published in the special issue *Advances in Analytical Separations* with Guest Editors Yolanda Pico and Joan O. Grimalt.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-011-4655-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. Navarro (✉) · P. Sanz · M. Á. Martínez
Persistent Organic Pollutant Group, Environment Department,
CIEMAT,
Avda. Complutense 22,
28040 Madrid, Spain
e-mail: i.navarro@ciemat.es

partitioning behaviour of PFAS to solids [11, 12]. In wastewater treatment plants (WWTPs), chemicals being recalcitrant to biodegradation processes are expected to be removed mostly by sorption on suspended solids and subsequent sedimentation [13].

Sewage sludges proceeding from wastewater treatment plants located downstream from industries, which use or have been using PFAS, for instance, chromium plating plants, paper and cardboard facilities or textile plants, are prone to contain elevated PFAS concentrations. Even in case where the industry stops the production or use of PFAS, the persistent nature of these chemicals in combination with their surface properties could cause a significant PFAS concentration years after the use of a PFAS-free alternative. Therefore, sewage sludge could be considered as one of the most important secondary sources of these chemicals because accumulates not only PFAS which are currently used but also those PFAS which have been emitted in the past.

The current waste policy of the European Union (EU) is based on avoiding, reusing, recycling or recovering the waste to the extent possible. The total quantities (i.e. production) of sludge in the EU are currently estimated at 10.13 million tons (dry solids) and nearly 40% is estimated to be spread on land for agricultural use. The recycling of sludge to agriculture varies greatly among Member States. About 1,065,000 tons (dry solid) of sludge were produced in Spain during 2006, and about 687,000 tons (dry solid) were recycled to agriculture, equivalent of 65% of the sludge produced [14]. The application of sludge for land treatment or its disposal on dump sites could lead to a remobilization of these recalcitrant compounds [15]. Therefore, it is necessary to assess the presence of these compounds in sewage sludges to manage them properly and to revise the European Directive 86/278/EEC [16] concerning the application of WWTP sludge to soil for agricultural purposes in order to establish new limits for pollutants considered at first and increase the number of chemicals analysed, mainly in regard to new emerging compounds as perfluorinated compounds. An EU-initiative to improve the present situation for sludge management proposed limit values for concentration of heavy metals and organic compounds (including persistent organic pollutants—POPs—such as polychlorinated biphenyls, dibenzo-*p*-dioxins and furans) in sludge for use on land [17]. Some European countries have already fixed limit concentrations for some organic pollutants but the pollutants regulated and the limits fixed are different from one country to another, supposing a complex and controversial issue [18]. In the case of PFAS, a target value for the sum of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) of 100 µg/kg dry mass has been established in Germany for agriculturally used sewage sludge [19].

Recently, PFOS has been considered as a persistent organic pollutant under of the Stockholm Convention [20] and listed in Annex B [4]. This fact involves its introduction in POP monitoring studies, including environmental and wildlife compartments, in order to determine and assess its global distribution.

Currently, limited studies regarding perfluorinated alkyl substances have been published. Besides, there are few studies focused on waste matrices, concretely on sewage sludge and there is no adopted any standard analytical method for testing PFAS in this kind of matrices. Due to their relatively low volatility, good solubility in water and lack of chromophores, the analysis of perfluorinated alkyl substances is a challenging task. The analytical problems related to the determination of neutral and anionic PFAS are multiple, including aspects such as physicochemical properties, reliable standards, impurities, ion suppression and possible contamination during all stages of the analytical procedure. Extraction of PFAS from waste matrices and separation from interfering substances extracted together with these compounds is considered to be the main prerequisite for PFAS analysis in waste matrices. In most of the cases, the analytical procedure combines an agitation and centrifugation extraction with a unique clean up step based on solid-phase extraction or activated carbon particles [8, 21–23].

Consequently, due to the gap of knowledge regarding perfluorinated alkyl substances in sewage sludge, in this work, it is proposed an analytical method which allows the determination of 13 PFAS in sewage sludge. Target compounds were perfluorobutanesulfonate (PFBS), perfluorohexanesulfonate (PFHxS), PFOS, perfluorobutanoic acid (PFBA), perfluoropentanoic acid (PFPeA), perfluorohexanoic acid (PFHxA), perfluoroheptanoic acid (PFHpA), PFOA, perfluorononanoic acid (PFNA) and perfluorodecanoic acid (PFDA), perfluorooctanesulfonamide (FOSA), *N*-methyl perfluorooctanesulfonamide (*N*-MeFOSA) and *N*-ethyl perfluorooctanesulfonamide (*N*-EtFOSA). The application of the method to real samples demonstrates its efficiency and accuracy, as well as provides for the first time, to our knowledge, PFAS levels in sewage sludges from Spain.

Experimental

Chemicals

Solvents and reagents used in this work were of analytical or HPLC grade and were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

Standards solutions were provided from Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canada): non-labelled or native

compounds (PFBS, PFHxS, PFOS, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, FOSA, *N*-MeFOSA and *N*-EtFOSA), mass-labelled compounds used as surrogates (^{13}C -PFHxS, ^{13}C -PFOS, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDA, *N*-d3-MeFOSA and *N*-d5-EtFOSA) and used as internal standard ($^{13}\text{C}_5$ -PFNA). Non-labelled compounds were used to spike some blank samples (siliceous earth) and the Sludge D to validate the analytical methodology. Surrogate standards were spiked before extraction to quantify and control the analyte losses during all procedure. Internal standard was added to extracts just before analyses in the HPLC-MS/MS. Non-labelled and mass-labelled compounds (surrogates and internal) were also used to prepare the calibration standard solutions.

EnviCarb cartridges (500 mg, 6 ml) used to purify the extracts were provided from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Oasis WAX (Weak Anion Exchange mixed mode sorbent) cartridges (500 mg, 6 ml) used to purify and concentrate the analytes were obtained from Waters (Milford, MA, USA).

Sludge D from 12th Round of the International Intercomparison Study was used as reference material to validate the analytical methodology although its content of PFAS has not been yet certified [24].

Sample collection

Sewage sludge samples were collected from 20 wastewater treatment plants of different sizes and geographically distributed all over Spain from April to June 2006. Homogenized samples collected in polypropylene (PP) containers were dried at 40°C until constant weight. The different facilities were classified in three groups depending on the number of inhabitants associated to each plant: L (lowly populated area, <500,000 inhabitants), M (medium populated area, 500,000–1,000,000 inhabitants) and H (highly populated area, >1,000,000 inhabitants).

Sample preparation

One gram of sewage sludge spiked with ^{13}C -PFHxS, ^{13}C -PFOS, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDA, *N*-d3-MeFOSA and *N*-d5-EtFOSA solutions was extracted with 10 ml of methanol in a PP tube. Samples were agitated at room temperature for 10 min, ultrasonicated at 40°C for 30 min and centrifuged at 3,000 rpm for 15 min at room temperature. The supernatants were removed and transferred to a second PP tube. The ultrasonication and centrifugation processes were repeated with 9 ml of fresh methanol. The centrifugation process was repeated again with 9 ml of fresh methanol.

Extracts of each sample were then combined and were passed through EnviCarb cartridges (500 mg, 6 ml) to remove the potential matrix interferences. Cartridges were

previously activated and conditioned with 5 ml of methanol. Once samples passed through EnviCarb cartridges and were cleaned, the SPE tubes were washed with 1 ml of methanol to elute possible remaining target compounds and avoid possible losses. Then, extracts were diluted with Milli-Q water into 1 L in order to make the methanol content less than 5% and were homogenized. Solutions were loaded in Oasis WAX cartridges (500 mg, 6 ml) to pre-concentrate the analytes. Cartridges were previously activated and conditioned with 12 ml of 0.1% ammonium hydroxide in methanol and 12 ml of Milli-Q water. After loading the samples, SPE tubes were washed with 12 ml of 25 mM sodium acetate buffer (pH 4) and the target analytes were eluted with 8 ml of 0.1% ammonium hydroxide in methanol. An aliquot was taken from the final extract and was spiked with $^{13}\text{C}_5$ -PFNA solution before the injection in HPLC-MS/MS.

Instrumental analysis and quantification

HPLC conditions

The chromatographic separation was performed using a Varian LC 212 liquid chromatograph (Varian, CA, USA). A 20- μl aliquot of the extract was injected into a Varian Polaris C18 A analytical column (50 mm \times 2.0 mm and 3 μm particle diameter) kept at 40°C. The oven column temperature was studied in a range of 25–55°C and 40°C was chosen as the suitable temperature for the analyte separation.

Several mobile phases were evaluated: 2 mM ammonium acetate in Milli-Q water (A) and methanol (B), 10 mM ammonium acetate in Milli-Q water (A) and methanol (B), 2 mM ammonium acetate in Milli-Q water (A) and acetonitrile (B), 10 mM ammonium acetate in Milli-Q water (A) and acetonitrile (B), 0.15% acetic acid in Milli-Q water (A) and 50% methanol/acetonitrile with 0.15% acetic acid (B), 10 mM ammonium acetate in Milli-Q water/acetonitrile (90:10; A), and 50% methanol/acetonitrile (B). The mobile phase selected as optimal was 2 mM ammonium acetate in Milli-Q water (A) and methanol (B). The gradient started at 5% B at 200 $\mu\text{l min}^{-1}$ flow rate, then was increased to 80% B in 5 min, changed to 100% B in 5 min and hold at that level for 5 min before reversion to original conditions at the 18 min time point.

Optimization of MS/MS parameters

In the present study, the HPLC was interfaced with a Varian 320 MS triple quadrupole mass spectrometer. Analyses were carried out in negative electrospray ionization (ESI) mode using selected reaction monitoring technique. ESI interface and mass spectrometer parameters were optimized

Table 1 List of target compounds analysed, selected reaction monitoring transitions, capillary voltages and collision energies values

Compound	Formula	MS/MS mass transition monitored (<i>m/z</i>)	Daughter ion	Capillary voltage (V)	Collision energy (eV)
PFBS	C ₄ F ₉ SO ₃ [−]	<i>299 > 99</i>	[FSO ₃] [−]	−45	30
		<i>299 > 299</i>	[M-H] [−]	−45	30
PFHxS	C ₆ F ₁₃ SO ₃ [−]	<i>399 > 99</i>	[FSO ₃] [−]	−100	35
		<i>399 > 399</i>	[M-H] [−]	−100	35
PFOS	C ₈ F ₁₇ SO ₃ [−]	<i>499 > 80</i>	[SO ₃] [−]	−110	50
		<i>499 > 499</i>	[M-H] [−]	−110	50
PFBA	C ₃ F ₇ CO ₂ H	<i>213 > 169</i>	[C ₃ F ₇] [−]	−25	5
PFPeA	C ₄ F ₉ CO ₂ H	<i>263 > 219</i>	[C ₄ F ₉] [−]	−35	10
		<i>263 > 263</i>	[M-H] [−]	−35	5
PFHxA	C ₅ F ₁₁ CO ₂ H	<i>313 > 269</i>	[C ₅ F ₁₁] [−]	−35	10
		<i>313 > 313</i>	[M-H] [−]	−35	5
PFHpA	C ₆ F ₁₃ CO ₂ H	<i>363 > 319</i>	[C ₆ F ₁₃] [−]	−35	5
		<i>363 > 363</i>	[M-H] [−]	−35	5
PFOA	C ₇ F ₁₅ CO ₂ H	<i>413 > 369</i>	[C ₇ F ₁₅] [−]	−40	10
		<i>413 > 413</i>	[M-H] [−]	−40	5
PFNA	C ₈ F ₁₇ CO ₂ H	<i>463 > 419</i>	[C ₈ F ₁₇] [−]	−40	10
		<i>463 > 463</i>	[M-H] [−]	−40	5
PFDA	C ₉ F ₁₉ CO ₂ H	<i>513 > 469</i>	[C ₉ F ₁₉] [−]	−40	10
		<i>513 > 513</i>	[M-H] [−]	−40	5
FOSA	C ₈ F ₁₇ SO ₂ NH ₂	<i>498 > 78</i>	[SO ₂ N] [−]	−95	40
		<i>498 > 498</i>	[M-H] [−]	−95	30
<i>N</i> -MeFOSA	C ₈ F ₁₇ SO ₂ NHCH ₃	<i>512 > 169</i>	[C ₃ F ₇] [−]	−95	25
		<i>512 > 512</i>	[M-H] [−]	−95	30
<i>N</i> -EtFOSA	C ₈ F ₁₇ SO ₂ NHC ₂ H ₅	<i>526 > 169</i>	[C ₃ F ₇] [−]	−100	30
		<i>526 > 526</i>	[M-H] [−]	−100	30
[¹⁸ O ₂]-PFHxS	C ₆ F ₁₃ S ¹⁸ O ₂ ¹⁶ O [−]	<i>403 > 103</i>	[FS ¹⁸ O ₂ ¹⁶ O] [−]	−105	30
		<i>403 > 403</i>	[M-H] [−]	−105	35
[¹³ C ₄]-PFOS	¹³ C ₄ ¹² C ₄ F ₁₇ SO ₃ [−]	<i>503 > 80</i>	[SO ₃] [−]	−105	50
		<i>503 > 503</i>	[M-H] [−]	−105	50
[¹³ C ₄]-PFOA	¹³ C ₄ ¹² C ₄ HF ₁₅ O ₂	<i>417 > 372</i>	[M- ¹³ COOH] [−]	−30	10
		<i>417 > 417</i>	[M-H] [−]	−30	5
[¹³ C ₅]-PFNA	¹³ C ₅ ¹² C ₄ HF ₁₇ O ₂	<i>468 > 423</i>	[M- ¹³ COOH] [−]	−45	10
		<i>468 > 468</i>	[M-H] [−]	−45	5
[¹³ C ₂]-PFDA	¹³ C ₂ ¹² C ₈ HF ₁₉ O ₂	<i>515 > 470</i>	[M- ¹³ COOH] [−]	−45	10
		<i>515 > 515</i>	[M-H] [−]	−45	5
<i>N</i> -d3-MeFOSA	C ₉ D ₃ HF ₁₇ NO ₂ S	<i>515 > 169</i>	[C ₃ F ₇] [−]	−100	30
		<i>515 > 515</i>	[M-H] [−]	−100	30
<i>N</i> -d5-EtFOSA	C ₁₀ D ₅ HF ₁₇ NO ₂ S	<i>531 > 169</i>	[C ₃ F ₇] [−]	−100	30
		<i>531 > 531</i>	[M-H] [−]	−100	30

MS/MS transitions in italics are used for quantification

in order to improve the signal-to-noise (*S/N*) relation for each PFC: (N₂) drying gas temperature (range of study: 150–350°C), (N₂) drying gas pressure (range of study: 20–30 psi), (N₂) nebulizing gas pressure (50–65 psi), spray chamber temperature (30–60°C), spray shield voltage (300–600 V), needle voltage (1,000–4,000 V), (Ar) collision gas

pressure (1.6–2 mTorr), capillary voltage (20–110 V) and collision energy (5–50 V).

For the mobile phase chosen (2 mM ammonium acetate in Milli-Q water (A) and methanol (B)), the drying gas pressure was set at 25 psi, 270°C drying gas temperature, 55 psi nebulizing gas pressure, 55°C spray chamber

Table 2 List of each target compound related to the proper mass-labelled compound used to quantify and mass-labelled compound used as internal standard

Compound	Mass-labelled compound (surrogate standards)	Mass-labelled compound (internal standard)
PFBS	[¹³ C ₄]-PFOS	[¹³ C ₅]-PFNA
PFHxS	[¹⁸ O ₂]-PFHxS	[¹³ C ₅]-PFNA
PFOS	[¹³ C ₄]-PFOS	[¹³ C ₅]-PFNA
PFBA	[¹³ C ₄]-PFOA	[¹³ C ₅]-PFNA
PFPeA	[¹³ C ₄]-PFOA	[¹³ C ₅]-PFNA
PFHxA	[¹³ C ₄]-PFOA	[¹³ C ₅]-PFNA
PFHpA	[¹³ C ₄]-PFOA	[¹³ C ₅]-PFNA
PFOA	[¹³ C ₄]-PFOA	[¹³ C ₅]-PFNA
PFNA	[¹³ C ₄]-PFOA	[¹³ C ₅]-PFNA
PFDA	[¹³ C ₂]-PFDA	[¹³ C ₅]-PFNA
FOSA	[¹³ C ₄]-PFOS	[¹³ C ₅]-PFNA
N-MeFOSA	N-d3-MeFOSA	[¹³ C ₅]-PFNA
N-EtFOSA	N-d5-EtFOSA	[¹³ C ₅]-PFNA

temperature, 1.8 mTorr collision gas pressure, −450 V spray shield voltage and −2,000 V needle voltage. The optimal values for capillary voltage and collision energy for each PFC are detailed in Table 1.

Quality control

One of the problems associated with PFAS analysis is background contamination in the analytical blanks [25]. To minimize it, the polytetrafluoroethylene tubing of the instrumental equipment was substituted for polyetherether-

ketone. For samples analysis, procedural blanks (siliceous earth purified and calcined extrapure) were processed identical to samples for monitoring contamination during the extraction and purification steps. Instrumental blanks (100% methanol) were injected every three to four samples to monitor carry-over. Glassware was avoided during all analytical procedure because of the possible PFAS adsorption to the glass, only polypropylene and polyethylene materials were used throughout the treatment and measurement of samples.

Quantification procedure

Quantification of target analytes was carried out by isotopic dilution method if proper standards were available. This method is based on relative response factors between the mass-labelled compounds added to samples prior to extraction and the target compounds, and response factors between the mass-labelled compounds added to samples prior to extraction and the mass-labelled compound added to extracts just before analyses in the HPLC-MS/MS. Calibration curves were prepared in methanol with non-labelled PFAS concentrations of 1, 2, 10, 20, 50, and 100 pg/μl and mass-labelled compounds were maintained at 20 pg/μl. The relative response factor in the calibration standard solutions is calculated using a linear regression. The relative response factor of each non-labelled compound relative to its mass-labelled analogue is determined using the area responses and concentrations for each calibration standard solution. An averaged relative response factor is used for each native compound if the relative response factor is constant (less than 20% coefficient of variation) over the calibration range. The response factor of each

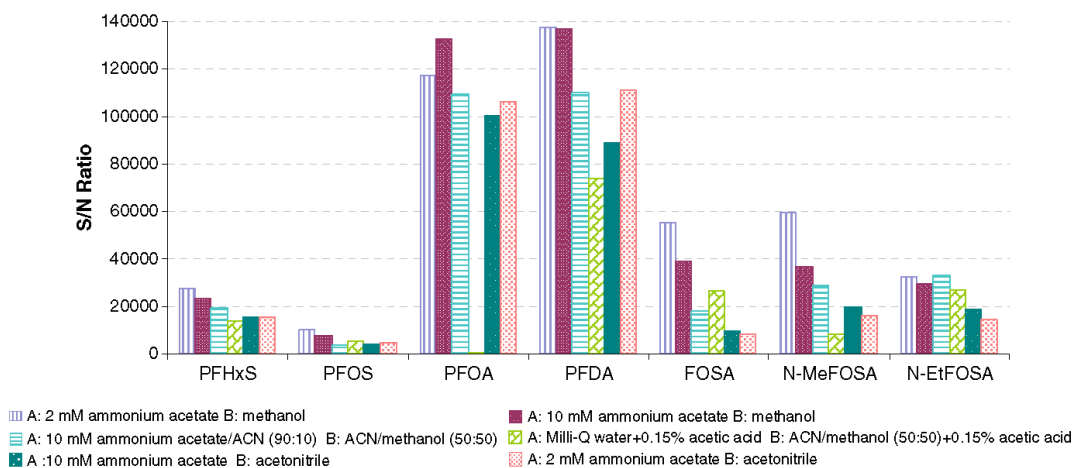
**Fig. 1** Evaluation of the several mobile phases for the analysis of PFAS

Table 3 Instrumental parameters of the HPLC-MS/MS method developed for the analysis of PFAS. Standard solutions (n=3)

Compound	R^2	Accuracy (%)	LOD (pg)	LOQ (pg)	Repeatability (RSD%)	Reproducibility (RSD%)
PFBS	0.998	88	0.096	0.321	18	22
PFHxS	0.999	94	0.113	0.377	6	9
PFOS	0.999	84	0.105	0.349	2	20
PFBA	0.999	91	1.945	6.483	2	7
PFPeA	0.998	92	2.217	7.391	2	4
PFHxA	0.999	92	0.166	0.552	17	7
PFHpA	0.999	86	0.417	1.391	4	11
PFOA	0.995	97	0.891	2.971	3	1
PFNA	0.997	99	0.025	0.083	8	3
PFDA	0.998	88	0.011	0.035	11	9
FOSA	0.998	98	0.011	0.036	15	20
N-MeFOSA	0.997	88	0.007	0.024	8	6
N-EtFOSA	0.999	93	0.014	0.048	3	1

mass-labelled compound relative to a selected mass-labelled compound (internal standard) is also determined using the area responses and concentrations for each calibration standard solution. The relative response factors are used to determine the target analyte concentration in the sample and the response factors are used to calculate and control the target analyte losses during all procedure.

Due to absence of proper mass-labelled compound standards to each target compound analysed, some available mass-labelled compound standards had to be selected for quantification and another one was chosen to calculate the recoveries of the mass-labelled compounds during the analytical procedure. Details about standards used are described in Table 2.

Identification was verified by retention time and parent to daughter ion transition. Daughter ion transition was used

for quantification and parent ion transition for confirmation of the PFAS selected.

Results and discussion

HPLC-MS/MS conditions

Several mobile phases were considered to reach the best chromatographic separation of target compounds and to achieve the best relation signal/noise, and consequently, the lowest limits of detection (Fig. 1). The mobile phase selected was 2 mM ammonium acetate in Milli-Q water (A) and methanol (B) because they allowed to achieve higher S/N ratio and an adequate chromatographic separation of the compounds. Good separation and S/N ratio values were

Table 4 Quality parameters of the methodology developed for the analysis of PFAS. Sludge D (n=4)

Compound	R^2	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Repeatability (RSD%)
PFBS	0.992	0.02	0.07	5
PFHxS	0.999	0.02	0.08	9
PFOS	0.997	0.08	0.27	17
PFBA	0.996	0.18	0.59	10
PFPeA	0.991	0.21	0.71	3
PFHxA	0.999	0.08	0.25	4
PFHpA	0.998	0.01	0.01	4
PFOA	0.999	0.08	0.27	4
PFNA	0.994	0.01	0.02	4
PFDA	0.992	0.06	0.21	12
FOSA	0.998	0.01	0.04	16
N-MeFOSA	0.991	0.01	0.02	19
N-EtFOSA	0.998	0.03	0.09	22

obtained also with 10 mM ammonium acetate in Milli-Q water (A) and methanol (B) mobile phase, however, a lower ammonium acetate concentration was preferred to preserve the useful life of the chromatographic column.

Another HPLC parameter as oven column temperature (40°C) and several electrospray ionization chamber parameters as drying gas temperature (270°C), drying gas pressure (25 psi), nebulizing gas pressure (55 psi), spray chamber temperature (55°C), spray shield voltage (−450 V) and needle voltage (−2,000 V) were optimized to obtain the best results. Details are shown in the [Electronic supplementary material](#).

Some MS/MS parameters were optimized to achieve the suitable collision induced dissociation (CID) of the parent ions for formation of the product ions: collision gas pressure (1.8 mTorr; see [Electronic supplementary material](#)), capillary voltage and collision energy. The optimal values for capillary voltage and collision energy are detailed in Table 1.

Validation of the analytical method

Firstly, instrumental parameters of the method developed for the analysis of PFAS were evaluated using standards (Table 3). The calibration curves obtained in the concentration range assessed (1–100 pg/μl) were linear for all compounds with determination coefficient (R^2) ranging from 0.995 to 0.999. Method accuracy was tested using a standard solution (non-labelled and mass-labelled analytes at concentrations of 20 pg/μl). This solution was injected directly into HPLC-MS/MS ($n=3$) and was quantified to determine its concentration. The theoretical concentration value and the values obtained in the analyses were compared to determine the accuracy. Non-labelled values obtained, ranging from 84 to 99%, show good accuracy. The limit of detection (LOD) is defined as the minimum amount of target analyte producing a chromatographic peak with a signal-to-noise ratio of 3 and the limit of quantification (LOQ) as the minimum concentration with a signal-to-noise ratio of 10. Instrumental LOD and LOQ were calculated with the lowest concentration standard solution used in the calibration curve. Repeatability was carried out by three consecutive injections of a standard solution (non-labelled and mass-labelled analytes at concentrations of 20 pg/μl) and reproducibility by three injections made on three different days within a week. The relative standard deviations (RSD) calculated for the target analytes at repeatability were from 2% to 18%. The values obtained at reproducibility were slightly higher, from 1% to 22%. These results indicate a good intra- and inter-assay variation because the values of the RSD are below 20% and 25%, respectively.

Due to the absence of certified reference materials for the analytes and matrices of interest at the time of the

experiments, to test the analytical methodology developed, four blank samples constituted for 1 g of siliceous earth extrapure and four replicas of 1 g of Sludge D from the 12th Round of the International Intercalibration Study were spiked with the 13 target analytes (PFBS, PFHxS, PFOS, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, FOSA, *N*-MeFOSA and *N*-EtFOSA) and the six surrogate (^{13}C -PFHxS, ^{13}C -PFOS, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDA, *N*-d3-MeFOSA and *N*-d5-EtFOSA) standard solutions and were extracted, purified and analysed as detailed previously in the “[Sample preparation](#)” section. Sludge D from the 12th Round of the International Intercalibration Study was used as reference material although its content of PFAS has not been yet certified. Therefore, prior to use, this sludge to validate the analytical methodology, four replicas were extracted, purified and analysed as detailed previously to determine its content of PFAS. Only PFOA (0.79 ± 0.11 ng/g d.w.) and PFDA (0.44 ± 0.47 ng/g d.w.) were detected. These values were considered in order to spike adequately the sample and were considered in the calculations.

The accuracy of the methodology was estimated by non-labelled compounds recoveries. These values were obtained considering the theoretical non-labelled compound standard concentration spiked in the blank and Sludge D samples prior to extraction. Recovery values of surrogate standards were calculated using the mass-labelled compound standard

Table 5 Recoveries of non-labelled and surrogate standards spiked in four blank samples (siliceous earth) and four replicas of Sludge D

Compound	Blank samples (siliceous earth; $n=4$) recovery (%; mean \pm SD)	Sludge D samples ($n=4$) recovery (%; mean \pm SD)
PFBS	141 \pm 27	129 \pm 7
PFHxS	96 \pm 16	124 \pm 11
PFOS	94 \pm 6	111 \pm 19
PFBA	137 \pm 11	122 \pm 12
PFPeA	135 \pm 22	128 \pm 4
PFHxA	80 \pm 18	109 \pm 4
PFHpA	101 \pm 25	122 \pm 5
PFOA	104 \pm 19	108 \pm 4
PFNA	114 \pm 20	112 \pm 4
PFDA	97 \pm 23	113 \pm 14
FOSA	69 \pm 11	76 \pm 12
<i>N</i> -MeFOSA	74 \pm 14	64 \pm 12
<i>N</i> -EtFOSA	80 \pm 24	93 \pm 20
[$^{18}\text{O}_2$]-PFHxS	59 \pm 5	60 \pm 7
[$^{13}\text{C}_4$]-PFOS	73 \pm 11	72 \pm 7
[$^{13}\text{C}_4$]-PFOA	70 \pm 11	73 \pm 4
[$^{13}\text{C}_2$]-PFDA	79 \pm 11	77 \pm 2
<i>N</i> -d3-MeFOSA	28 \pm 9	46 \pm 6
<i>N</i> -d5-EtFOSA	24 \pm 13	42 \pm 6

selected as internal standard ($^{13}\text{C}_5$ -PFNA). Results are shown in Table 4.

Considering data obtained for blank samples (siliceous earth), non-labelled compounds recoveries for the majority of the compounds were higher than 80%, ranged from 69% to 141%. The values related to recoveries of surrogate standards were higher than 70% in most of the cases. However, recoveries for *N*-d3-MeFOSA and *N*-d5-EtFOSA were relatively low, 28% and 24%, respectively. As it was shown previously in the “Chemicals” section, $^{13}\text{C}_5$ -PFNA standard solution was used as internal standard and consequently, used in recovery calculations. $^{13}\text{C}_5$ -PFNA is a perfluoroalkylcarboxylate while *N*-d3-MeFOSA and *N*-d5-EtFOSA are perfluorooctanesulfonamides, this difference of nature could cause different behaviour during the analysis and explain the low results obtained, indicating that $^{13}\text{C}_5$ -PFNA may not be optimal for calculating recoveries of certain compounds.

Regarding analyses of Sludge D, results are shown in Tables 4 and 5. LOD ranged from 0.01 to 0.21 ng/g and

LOQ ranged from 0.02 to 0.71 ng/g. Repeatability of the sample preparation step was evaluated for four replicas of Sludge D in the same day. The RSD calculated for the target analytes at repeatability were from 4% to 21%. The accuracy of the methodology was estimated by non-labelled compounds recoveries obtained (see Table 5). Non-labelled compounds recoveries were higher than 80% for most of the compounds, ranging from 64% to 129%. The mass-labelled or surrogate standard recoveries were higher than 60% in most of the cases. The recoveries for *N*-d3-MeFOSA and *N*-d5-EtFOSA were also lower than those for the rest of the compounds, 46% and 42%, respectively, but relatively higher than in blank samples (siliceous earth).

Application to sewage sludge samples

Twenty sewage sludge samples were extracted, purified and analysed as has been described. Results are shown in Table 6. PFHxS, PFOS, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA and PFDA were found in most of the sewage sludge,

Table 6 Levels of perfluorinated compounds in sewage sludge from Spanish WWTPs (ng/g d.w.)

ID sample	PFHxS	PFOS	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA
L1	<0.03	30.04	<0.15	<0.13	<0.07	1.35	<0.08	3.34
L2	<0.14	43.47	1.81	<0.04	<0.03	1.33	<0.26	0.34
L3	<0.02	<0.40	2.66	1.31	<0.02	5.43	<0.02	1.28
L4	18.20	95.77	3.36	<0.10	<0.10	2.85	<0.02	2.44
L5	<0.02	32.73	<0.45	2.60	2.04	7.94	10.23	21.47
L6	<0.02	143.75	2.92	<0.05	<0.13	2.20	<0.01	2.93
L7	<0.05	24.71	<0.14	1.54	<0.01	4.63	<0.18	6.23
L8	<0.02	<0.84	2.45	<0.19	0.87	3.05	<0.01	4.72
L9	<0.01	26.54	<0.15	<0.05	<0.26	1.58	3.01	24.29
L10	<0.01	77.63	<0.26	<0.07	<0.08	2.13	<0.16	4.59
L11	<0.03	<0.03	<0.36	<0.30	<0.18	5.90	1.18	5.55
L12	7.09	<0.03	<0.44	<0.15	<0.30	0.92	<0.01	7.22
M1	<0.01	249.40	<0.18	<0.04	<0.05	4.18	2.13	1.98
M2	<0.01	<0.02	2.58	1.16	<0.05	1.54	<0.02	1.14
M3	<0.04	286.81	<0.35	<0.23	<0.08	2.94	4.06	14.04
M4	<0.02	<0.01	4.69	<0.10	0.96	<0.03	<0.04	<0.04
M5	<0.02	<0.02	<0.22	<0.03	<0.05	1.87	1.10	2.02
M6	<0.01	<0.11	2.07	<0.07	<0.01	1.04	1.01	0.80
H1	3.48	208.81	<0.08	<0.12	<0.28	4.98	<0.15	2.85
H2	<0.01	58.59	<0.05	<0.03	<0.08	1.04	1.00	1.00
Range	<0.01–18.20	<0.01–286.81	<0.05–4.69	<0.03–2.60	<0.01–2.04	<0.03–7.94	<0.01–10.23	<0.04–24.29
Mean	1.46	63.99	1.27	0.42	0.28	2.85	1.23	5.41
SD	4.30	89.05	1.14	0.69	0.49	2.04	2.40	6.78
LOD	0.01–0.29	0.01–1.02	0.05–1.81	0.03–0.67	0.01–0.70	0.03–0.33	0.01–0.26	0.01–0.60

<x: below limit of detection

PFBS, PFBA, FOSA, *N*-MeFOSA and *N*-EtFOSA were not detected in any sludge. Limits of detection of these compounds were 0.01–0.72 ng/g d.w., 0.12–1.88 ng/g d.w., 0.01–0.04 ng/g d.w., 0.01–0.46 ng/g d.w. and 0.01–0.02 ng/g d.w. respectively

but PFBS, PFBA, FOSA, *N*-MeFOSA and *N*-EtFOSA were not detected in any samples. PFOA and PFDA were found in 95% of the samples, followed by PFOS (60%), PFPeA and PFNA (40%), PFHxA (20%) and PFHxS and PFHpA (15%). Limits of detection varied depending on the compound and the sample considered. This variability could be explained by the different nature and origin of the sewage sludges evaluated. No PFAS were detected in any instrumental blanks injected every three samples. Nevertheless, PFOA, PFNA and PFDA were found in several procedural blanks at levels below the limit of quantification. Recovery values were calculated by the addition of mass-labelled compounds prior to the extraction (surrogate standards) and mass-labelled compound used as internal standard ($^{13}\text{C}_5$ -PFNA) just before the injection into HPLC instrument. Values obtained in the analyses of the twenty sludge samples were suitable for most of the compounds: ^{13}C -PFHxS ($63\% \pm 13\%$), ^{13}C -PFOS ($71\% \pm 13\%$), $^{13}\text{C}_4$ -PFOA ($62\% \pm 8\%$), $^{13}\text{C}_2$ -PFDA ($52\% \pm 7\%$), *N*-d3-MeFOSA ($61\% \pm 18\%$) and *N*-d5-EtFOSA ($68\% \pm 25\%$).

Variation in relative composition of individual PFAS in sludge was found (see Fig. 2). This variability could depend on the characteristics of the investigated WWTPs and their different treatment processes. WWTPs present a variety of treatment processes and the effects of combination of these processes on PFAS are not clear. PFOS was the compound with higher concentrations, achieving 286.81 ng/g dry weight (d.w.), greater than the perfluorocarboxylates (PFCAs) studied. The contribution of PFOS in the total

PFAS concentration is clearly significant, while PFOA was detected in lower levels, ranging from 0.92 to 7.94 ng/g d. w. and PFDA from 0.34 to 24.29 ng/g d.w. Similar behaviour has been reported for sludge coming from different countries, in 2008 in Hong Kong (3.1–7304.9 ng/g PFOS and 1.3–15.7 ng/g PFOA) [23], from The Netherlands in 2009 (35.4–47.7 ng/g PFOS and no detected levels for PFOA) [26], in WWTPs sludge collected in Ontario in 2002 (0.068–460 ng/g PFOS and 0.11–4.5 ng/g PFOA) [27], in sewage sludge samples from Germany collected in 2009 (<1.0–1,910 ng/g PFOS and <1.0–405 ng/g PFOA) [28], in sludge samples from Kentucky WWTP collected during 2005 (8.2–993 ng/g PFOS and 8.3–219 ng/g PFOA) [29], in sludge collected during 2004 in the Pacific Northwest, USA (42–100 ng/g PFOS and <3–7.1 ng/g PFOA) [30] and in WWTPs sludge from USA collected from 1998 to 2004 (14.4–2,610 ng/g PFOS and <6–29.4 ng/g PFOA) [8]. On the contrary, PFOA dominance was detected in some sludge samples collected during 2005 in New York State (<10–65 ng/g PFOS and 18–241 ng/g PFOA) [21] and in sludge samples from Georgia WWTP during 2005 (<2.5–77 ng/g PFOS and 7.0–130 ng/g PFOA) [29].

Total perfluorocarboxylates (ΣPFCAs) levels in sludge were consistently lower than the total levels of perfluoroalkylsulfonates (ΣPFASs). Considering the target value established in Germany of 100 $\mu\text{g/kg}$ d.w. for the sum of PFOS and PFOA, the 20% of the Spanish sewage sludges studied exceed it significantly, owing to the contribution of PFOS.

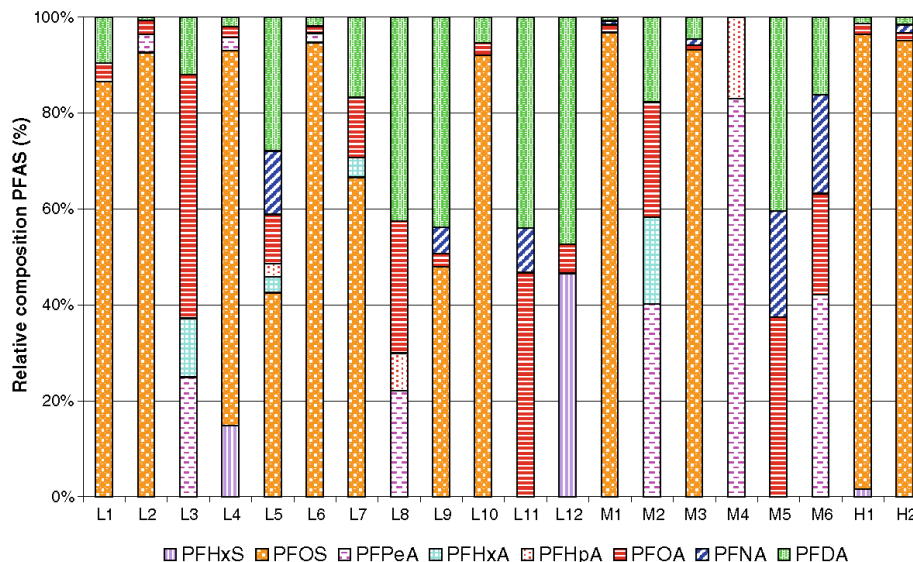


Fig. 2 Relative composition of individual PFAS in sewage sludge

Biodegradation of precursor compounds during activated sludge treatment is a likely source of these PFAS. 2-(*N*-ethyl-perfluorooctanesulfonamido)ethanol (*N*-EtFOSE alcohol) and 2-(*N*-ethyl-perfluorooctane sulfonamido) acetic acid (*N*-EtFOSEA) are biotransformed to PFOS [31, 32]. 8:2 FTOH (fluorotelomer alcohol) may biodegrade to form PFOA and possibly PFNA and 10:2 FTOH may lead to the formation of PFDA and PFUnA (perfluoroundecanoic acid) in wastewater treatment sludge [33]. This fact could explain the predominance of PFOS, PFOA and PFDA in the sewage sludge analysed.

Overall, no correlation between number of inhabitants related to each facility studied and PFAS concentration in the sludges was found.

Consequently, the present study provides an effective analytical method with the capacity to determine, by unique injection, 13 of the most environmentally relevant PFAS in sewage sludge matrices at trace levels. These 13 compounds involve 7 perfluoroalkylcarboxylates, 3 perfluoroalkylsulfonates and 3 perfluorooctanesulfonamides. Due to incorporation of PFOS to Stockholm Convention, the introduction of this compound in POP monitoring studies in all kind of matrices, including environmental compartments and wildlife, is an imminent necessity. Therefore, the methodology developed could be adequate and applied by those laboratories implicated in monitoring studies regarding waste matrices.

Additionally, lines of evidence of the presence of several PFAS in sewage sludge from Spain have been shown. Considering the importance of recycling of sludge to agriculture in Spain and several countries of European Union, further research should be done to evaluate the content of these compounds in sludge in order to avoid the increase of PFAS concentration in soil and their transference to the environmental compartments and food chain.

Acknowledgements This study has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and European Regional Development Fund (Project number CTM2007-62801).

References

1. Kissa E (2001) Fluorinated surfactants and repellents, 2nd edn. Marcel Dekker, New York
2. Giesy JP, Kannan K (2001) Environ Sci Technol 35:1339–1342
3. Giesy JP, Kannan K (2002) Environ Sci Technol 36:146A–152A
4. Fourth Meeting of the Conference of the Parties to the Stockholm Convention (COP4) (2009) Earth Negotiations Bulletin, International Institute for Sustainable Development (IISD), 15. <http://www.iisd.ca/chemical/pops/cop4/>. Accessed 27 Oct 2010
5. Martin JW, Smithwick MM, Braune BM, Hoekstra PF, Muir DCG, Mabury SA (2004) Environ Sci Technol 38:373–380

6. Kannan K, Koistinen J, Beckmen K, Evans T, Gorzelany JP, Hansen KJ, Jones PD, Helle E, Nyman M, Giesy JP (2001) *Environ Sci Technol* 35:1593–1598
7. Shoeib M, Harner T, Vlahos P (2006) *Environ Sci Technol* 40:7577–7583
8. Higgins CP, Field JA, Criddle CS, Luthy RG (2005) *Environ Sci Technol* 39:3946–3956
9. Yamashita N, Taniyasu S, Petrick G, Wei S, Gamo T, Lam PKS, Kannan K (2008) *Chemosphere* 70:1247–1255
10. Sulfonated perfluorochemicals in the environment: sources, dispersion, fate and effects. 3M, St. Paul, MN, 2000
11. Shivakoti BR, Tanaka S, Fujii S, Kunacheva C, Boontanon SK, Musirat C, Seneviratne STM, Tanaka H (2010) *J Environ Monit* 12:1255–1264
12. Moore J, Rodericks J, Turnbull D, Warren-Hicks W (2003) Environmental and health assessment of perfluorooctane sulfonic acid and its salts. 3M
13. Katsoyiannis A, Samara C (2007) *Environ Sci Pollut Res* 14:284–292
14. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land, Final report, Part I Overview Report (2008) Milieu, WRc, RPA. http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/part_i_report.pdf. Accessed 27 Oct 2010
15. Schröder HF (2003) *J Chromatogr A* 1020:131–151
16. Council Directive 86/278/EEC on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. <http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/>. Accessed 27 Oct 2010
17. EU Working document on sludge, 3rd draft (2000) Brussels. http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/sludge_en.pdf. Accessed October 2010
18. Aparicio I, Santos JL, Alonso E (2009) *Waste Manage* 29:1747–1753
19. Grümping R, Stegemann D, Homburg B, Petersen M, Opel M (2007) *Organohalogen Compd* 69:2896–2899
20. The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (2001) <http://chm.pops.int/> Accessed 27 Oct 2010
21. Sinclair E, Kannan K (2006) *Environ Sci Technol* 40:1408–1414
22. Powley CR, George SW, Ryan TW, Buck RC (2005) *Anal Chem* 77:6353–6358
23. Ruowei M, Kaimin S (2010) *Environ Pollut* 158:1354–1362
24. Van Bavel B (2007) Final Report 12th Round of the International Intercomparison Study. International Intercomparison Study
25. Yamashita N, Kannan K, Taniyasu S, Horii Y, Okazawa T, Petrick G, Gamo T (2004) *Environ Sci Technol* 38:5522–5528
26. De Boer J, Esparza X, van Leeuwen SPJ, Moyano E, Galceran MT (2010) *Organohalogen Compd* 72
27. D'eon JC, Crozier PW, Furdul VI, Reiner EJ, Libelo EL, Mabury SA (2009) *Environ Sci Technol* 43:4589–4594
28. Petersen M, Opel M, Neugebauer F, Paepke O (2009) *Organohalogen Compd* 71:2095–2097
29. Loganathan BG, Sajwan KS, Sinclair E, Kumar KS, Kannan K (2007) *Water Res* 41:4611–4620
30. Schultz MM, Higgins CP, Huset CA, Luthy RG, Barofsky DF, Field JA (2006) *Environ Sci Technol* 40:7350–7357
31. Lange CC, 3M Environmental Laboratory (2000) The aerobic biodegradation of *N*-EiFOSE alcohol by the microbial activity present in municipal wastewater treatment sludge; Report CA058, DocketAR-226-1030a078; U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC
32. Rhoads KR, Janssen EML, Luthy RG, Criddle CS (2008) *Environ Sci Technol* 42:2873–2878
33. Lange CC, 3M Environmental Laboratory (2002) Biodegradation screen study for telomere type alcohols; Docket AR226-1149. U. S. Environmental Protection Agency, Washington

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

Analysis of perfluorinated alkyl substances in Spanish sewage sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Irene Navarro, Paloma Sanz, María Ángeles Martínez

Results and Discussion

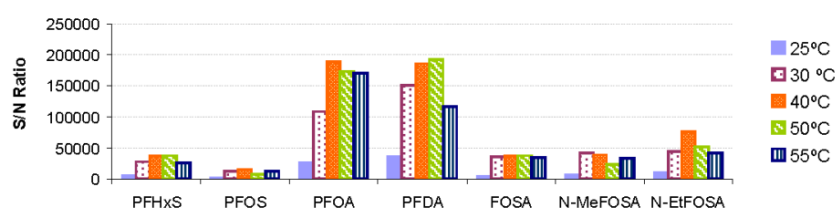
HPLC-MS/MS conditions

Some parameters were optimized to improve the separation of the target compounds, to maximize the ion formation and facilitate their introduction to the mass spectrometer.

The phase mobile chosen to reach an adequate chromatographic separation of the target compounds was 2mM ammonium acetate in Milli-Q water (A) and methanol (B). Once phase mobile was chosen, the oven column temperature was studied in a range from 25 to 55°C. At 25°C and 30°C the S/N ratio was too low, the maximum S/N ratio was achieved at 40°C. At 50°C and 55°C values were decreasing again (see Fig. S1)

Fig. S1

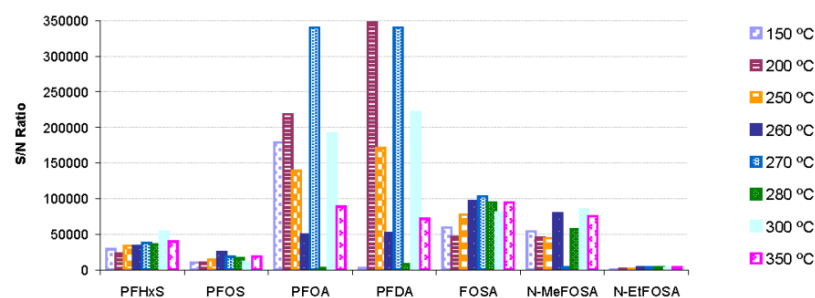
Evaluation of the effect of the oven column temperature in the analysis of PFAS.



Several electrospray ionization chamber parameters were optimized to maximize ion formation and transmission and minimize noise and source contamination. The drying gas temperature was studied, for the mobile phase selected, in the range from 150 to 350°C (see Fig. S2). Most of compounds had a good S/N ratio at 270°C, except N-MeFOSA which showed a low S/N ratio when this temperature was used. In the case of N-MeFOSA, the best S/N ratios were reached at 260 and 350°C, but these temperatures could not be used for the rest of the compounds because of their S/N ratios decrease. The drying gas pressure adequate at 270°C was 25psi.

Fig. S2

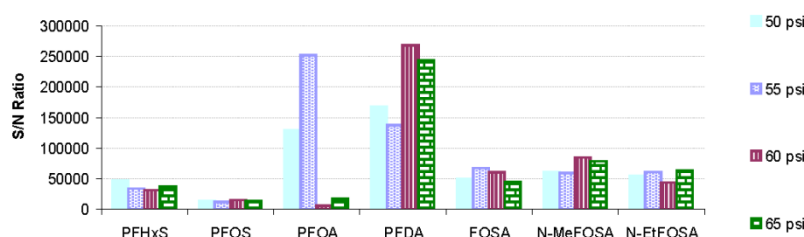
Evaluation of the N₂ drying gas temperature in the analysis of PFAS.



The nebulizing gas pressure was evaluated in the range of 50-65psi, being 55psi the pressure providing the best results for most of the compounds studied. In the case of 60psi and 65psi the signal of PFOA decreased although the values for the rest of the compounds were acceptable (Fig. S3).

Fig. S3

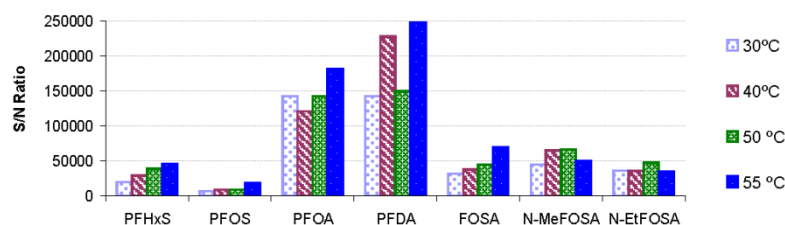
Evaluation of the N₂ nebulizing gas pressure in the analysis of PFAS.



Spray chamber temperature was tested between 30°C and 60°C. In this case, 55°C provided the best S/N ratio for most of the compounds; higher temperatures did not allow a good ionization (Fig. S4).

Fig. S4

Study of the effect of the spray chamber temperature in the analysis of PFAS.



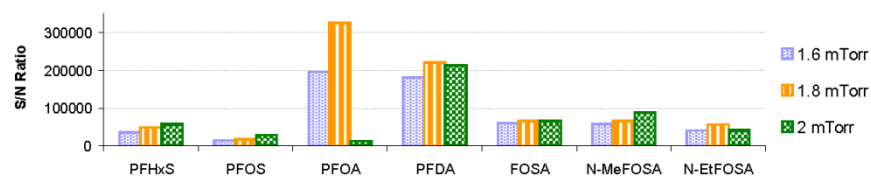
Spray chamber temperature was evaluated in a range from 30 to 60°C.
At 60°C, operational problems appeared, indicating that this temperature was not adequate.

The spray shield voltage facilitates the introduction of the ions formed in the spray chamber toward the mass spectrometer. This parameter was ranged from -300 to -600v, and the value selected was -450v. The X-Y position and voltage of the spray needle was necessary to maximize the nebulization efficiency and optimize the sensitivity and maximum robustness. The needle voltage was ranged from -1000 to -4000v; in this case, -2000v was considered as optimal value.

Some MS/MS parameters were optimized to achieve the suitable collision induced dissociation (CID) of the parent ions for formation of the product ions. The collision gas pressure was tested in the range of 1.6 and 2mTorr; 1.8mTorr provided good results for most of the analytes (Fig. S5).

Fig. S5

Study of the effect of the collision gas pressure in the analysis of PFAS.



ANEXO III

Artículo II

“Transfer of PFOS, BDE-209 and DP from biosolid amended soils to leachate and runoff water”.

Irene Navarro, Adrián de la Torre, Paloma Sanz, Miguel Ángel Porcel, Gregoria Carbonell, María de los Ángeles Martínez.

Enviado para su publicación.

Title

Transfer of PFOS, BDE-209 and DP from biosolid amended soils to leachate and runoff water

Authors

Irene Navarro^{a,*}, Adrián de la Torre^a, Paloma Sanz^a, Miguel Ángel Porcel^b, Gregoria Carbonell^b, María de los Ángeles Martínez^a

^aGroup of Persistent Organic Pollutants. Department of Environment, CIEMAT, Avda. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain.

^bLaboratory for Ecotoxicology. Department of the Environment, INIA, Ctra. La Coruña km 7.5, 28040 Madrid. Spain.

*Corresponding author: Tel: +34 91 346 61 43. Fax: +34 91 346 62 69. E-mail address: i.navarro@ciemat.es. (I. Navarro).

Abstract

Perfluoroalkyl substances, PFASs, and halogenated flame retardants, HFRs, have been detected in different environmental compartments. In order to assess the fate of these compounds in the soil - water system, a semi-field experiment was conducted following the implementation of agricultural organic waste. Therefore, four biosolids were fortified by addition of PFOS (~1 mg PFOS/kg biosolid), Deca BDE (~10 mg/kg) and DP (~0.26 mg/kg) commercial mixtures and were applied to the soil displayed in 15 trays. These trays, designed to collect the leachate and runoff water generated by natural rainfall, allowed to assess the pollutant mobility behavior in different environmental compartments. PFASs and HFRs were detected in leachate and runoff water originated in several rainfall events. The total mass distribution calculated in water samples showed higher content in runoff samples than leachate PFOS ($91 \pm 2\%$), BDE-209 ($76 \pm 17\%$) and DP ($83 \pm 14\%$). To compare PFOS, BDE-209 and DP mobility behavior, different environmental partitioning indexes were calculated. The highest mobility potential through the soil via runoff and leachate water was showed for PFOS. Besides, the partition coefficient (K_d) and organic carbon normalized partition coefficient (K_{oc}) for the sorption on biosolid amended soil were also evaluated.

Capsule:

First study to compare the migration behavior of PFOS, BDE-209 and DP from biosolid amended soil to leachate and runoff in a semi-field situation.

Keywords:

Perfluoroalkyl substances, polybrominated diphenyl ethers, biosolid, leachate, runoff.

1. Introduction

Perfluoroalkyl substances (PFASs) and halogenated flame retardants (HFRs) as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and dechlorane plus (DP) have been widely used in numerous industrial and commercial applications. As a consequence of their extensive production and use, these compounds have been detected in the environment, wildlife and humans (De la Torre et al., 2012; De Wit, 2002, 2010; Giesy and Kannan, 2001; Houde et al., 2006; Kannan et al., 2004; Law et al., 2003; Sverko et al., 2011). Due to their fate and distribution in the environment, toxicity, and bioaccumulation potential (Clarke and Smith, 2011; Kannan, 2011), particular attention concerning these emerging organic contaminants has been given in the recent years.

Wastewater treatment plants (WWTPs) have been identified as a significant source for these compounds in different environmental compartments (Eschauzier et al., 2013; Martellini et al., 2012). Previous studies have demonstrated that biosolids from WWTPs with no known specific industrial sources of fluorochemicals or halogenated retardants typically contain PFASs and HFRs at concentrations in the ng/g level (Clarke and Smith, 2011; De la Torre et al., 2011a, 2011b; Navarro et al., 2011). Biosolids are enriched in nitrogen, phosphorous and other trace elements as well as organic matter which make them a valuable source of nutrients and good soil conditioners for improving physical soil properties (Perkola et al., 2013). The mobilization of these compounds from biosolids or soils to water system could be a risk of contamination. Natural precipitation may dissolve soluble compounds or may carry suspended particulate matter from the biosolids or soils. In fact, water is considered the main transport pathway for propagation and distribution of PFASs in the environment (Armitage et al., 2009) and HFR could associate with fine particulates and colloids which could enhance their transport from the solids to the aqueous liquid phase (Cheng et al., 2014). Then, these pollutants could be transported by water through the soil and reach other environmental compartments as the groundwater and surface water and contribute to the wildlife and human exposure.

There are few studies that have characterized the fate and the transport of PFASs and HFRs from soils following the application of municipal biosolids, and the risk of contamination of adjacent surface or ground water (Gottschall et al., 2010; Lindstrom et al., 2011). Besides, several works are based in lysimeter experiment using leaching soil columns (Gellrich et al., 2012; Gorgy et al.,

2010, 2011; Stahl et al., 2013), where the water can mainly move vertically and not laterally, as may be the case in a natural system.

In the present study, a semi-field test was designed to simulate natural conditions and conducted to determine the leaching and runoff capacity of emerging pollutants -PFASs, PBDEs, Dechloranes (602, 603, 604, and DP), Chlordane Plus (CP) and Mirex- following the implementation of agricultural organic waste. To the best of our knowledge, this study is the first to compare, under the same experimental conditions, the migration behavior of PFOS, BDE-209 and DP from biosolid amended soil to leachate and runoff in a semi-field situation. Besides, the partition coefficient (K_d) and organic carbon normalized partition coefficient (K_{oc}) for the sorption on biosolid amended soil were calculated. These results are essential for the transfer assessment and the implications for the retention and release of these pollutants in the aquatic environment. Due to the different physicochemical properties of PFASs and HFRs, the comparison of their migration behavior would be of great interest. Besides, the migration potential of pollutants from biosolids should be carefully assessed to estimate the environmental risk associated with their application in agriculture.

2. Materials and methods

2.1. Study design

Firstly, several biosolids provided by Spanish waste management companies and WWTPs were characterized (Navarro et al., 2016), and only four biosolids were selected for the semi-field study: an aerobically digested municipal solid waste (MSW) compost (B-1), an anaerobically digested thermal drying sludge (B-2), an aerobically digested composted sewage sludge (B-3) and an anaerobically digested MSW compost (B-4). These four biosolids were fortified by addition of PFOS (~1 mg PFOS/kg biosolid), Deca BDE (~10 mg/kg) and DP (~0.26 mg/kg) commercial mixtures to check the fate of these compounds in the soil - water system.

The semi-field study was carried out in 15 trays (2.5 m length and 2 m width), containing a 5 cm of soil layer (sieved < 6 mm) supported by a metal frame with a 10 % slope. The fortified biosolids were applied at the top of the trays (0.5 m length and 2 m width) and two individual systems were connected to each tray for collecting independently leachate and runoff water. The system was not artificially irrigated, but was subjected only to natural rainfall and water could move vertically and laterally simulating a natural system. Leachate and runoff samples were collected for several rainfall events from 2011 to 2012: i) first rainfall event (October 28th 2011), ii) second rainfall event (November 7th 2011), iii) sum of all rainfall from November 23rd 2011 to May 7th 2012. After the rainfall events, two soil pool samples were taken from each tray: one

obtained from the top level (0.5 m length to the top, where fortified biosolids were added) and the other from the remaining surface (2 m to bottom). The four treatments and the control were performed in triplicate (three trays for each treatment) and the chemical analyses were conducted with pooled samples.

Considering physicochemical differences between target analytes (water solubility: 519 mg/L for PFOS (UNEP, 2006), 44 ng/L- 249 µg/L for DP (Xian et al., 2011) and < 0.1 µg/L for BDE 209 (USEPA, 2008)), and the fact that BDE-209 and DP are more likely to be associated with solids and particulate matter (Gorgy et al., 2011; He et al., 2014), water samples were filtered prior analysis. PFOS content was determined in the liquid phase while BDE 209 and DP levels were evaluated in the particulate matter obtained.

2.2. Sample treatment

For PFAS determination, waste and soil were spiked with MPFAC-MXA, N-d3-MeFOSA and N-d5-EtFOSA and extracted with methanol in a polypropylene tube by agitation (10 min; room temperature), ultrasonication (30 min; 40 °C) and centrifugation (15 min; 3000 rpm; room temperature). Then, extracts were purified by EnviCarb, diluted with Milli-Q water into 1 L and passed through Oasis WAX cartridges (Navarro et al., 2011). PFASs from leachate and runoff water were extracted with Oasis WAX and purified with EnviCarb cartridges. The final extracts were evaporated to 140 µL with nitrogen gas, reconstituted with 240 µL of methanol and 240 µL of 2 mM ammonium acetate in Milli-Q water and spiked with ¹³C₉-PFNA solution prior to HPLC-MS/MS injection.

The sample treatment for HFR analysis was based on methodology reported previously (De la Torre et al., 2011a, 2011b). Briefly, biosolids and soils were spiked with MBDE-MXE, MDBDPE and MDP solutions prior to pressurized fluid extraction (ASE 200, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). The extracts obtained in hexane:DCM (1:1 v/v) were solvent exchanged into hexane, digested with 50 mL of concentrated sulphuric acid. Then, the cleanup step was performed using a silica column (20 g silica: H₂SO₄ 44% w/w, 2 g anhydrous sodium sulphate) and completed with an automated purification Power Prep™ System (FMS Inc., USA) that includes acidic silica gel, basic alumina and carbon columns. Final fractions were concentrated to dryness with nitrogen gas, redissolved in nonane and spiked with the ¹³C injection standards solutions (BDE-CVS-EISS) prior to GC-MS analyses. Particulate matter samples from leachate and runoff were spiked and Soxhlet extracted with toluene for 20 h and then automated purified and concentrated according to the procedure previously described for biosolids and soils.

2.3. Instrumental analysis

PFASs determination was conducted by HPLC-MS/MS (Varian 212 Liquid Chromatograph coupled to a Varian 320 triple quadrupole MS). An ACE C18-PFP (50 x 2.1 mm, 3 µm) analytical column was used for the chromatographic separation using 2 mM ammonium acetate in Milli-Q water (A) and methanol (B) as mobile phase (Navarro et al., 2011). PBDEs and DBDPE analyses were performed by LRMS (Agilent 6890 Gas Chromatograph connected to an Agilent 5973 MSD). A short and narrow capillary column (15 m x 0.25 mm i.d. x 0.10 µm film thickness; DB5 MS from J&W Scientific, Folsom CA) was used for the chromatographic separation (De la Torre et al., 2011b). Dechlorane compounds were analyzed by ECNI-MS (Agilent 5973MSD) using methane as a reagent gas (De la Torre et al., 2011a).

2.4. Quality assurance

Procedural blanks were regularly conducted with each batch extraction under the same conditions. In addition, instrumental blanks consisting of methanol or nonane were tested before each sample injection to check the possibility of cross-contamination from analysis systems. Mean recovery for PFASs was $67 \pm 34\%$ (mean \pm SD), $102 \pm 27\%$ for PBDEs and $66 \pm 24\%$ for DP. Limits of detection (LODs), defined as the concentration giving a signal to noise ratio greater than 3 were in the range of 0.01-0.30 ng/L for PFASs, 2.10-8.13 pg/g for PBDEs and 1.00-8.70 pg/g for dechlorane compounds.

2.5. Calculations and statistical evaluation

Several environmental partitioning indexes used to evaluate the leaching tendency of organic contaminants (Gustafson, 1989; Laskowski et al., 1982; Papa et al., 2004; Wilson et al., 1996) have been utilised to PFOS, BDE-209 and DP to identify possible differences in partitioning trends. One model used to assess the potential degree of groundwater and river water contamination was the leaching potential (L_p) defined by Laskowski *et al.* as shown in Eq. (1) (Laskowski et al., 1982; Wilson et al., 1996):

$$L_p = \frac{S}{V_p \times K_{oc}} \quad (1)$$

where S=water solubility in mg/L at 25 °C, V_p =vapour pressure in Pascals (Pa) at 25 °C and K_{oc} =organic carbon-water partition coefficient in cm³/g. Compounds with higher leachability in the environment are indicated by the higher L_p values. The second model used establishes two leaching potential (leacher and non-leacher) based on sorption and persistence properties in soil and defined by a Groundwater Ubiquity Score (GUS) as follows, Eq. (2) (Gustafson, 1989; Papa et al., 2004; Wilson et al., 1996):

$$GUS = \log_{10} T_{1/2} \times (4 - \log_{10} K_{oc}) \quad (2)$$

where $T_{1/2}$ =half-life in soil in days and K_{oc} =organic carbon-water partition coefficient in cm^3/g . GUS values >2.8 are considered leacher compounds with high risk for contamination, GUS values between 1.8 and 2.8 are in a transition zone with an intermediate mobility, and GUS values <1.8 are non-leachers.

Besides, the sorption solid-liquid distribution coefficient (K_d) and organic carbon-water partition coefficient (K_{oc}) based in field situation was also calculated. K_d was defined as the ratio between the concentration of the compound in soils (ng/kg) and the concentration (ng/L) in water (leachate and runoff) (Zareitalabad et al., 2013). K_{oc} was calculated considering K_d and the soil organic carbon fraction (F_{oc}) as follows, Eq. (3) (Labadie and Chevreuil, 2011):

$$K_{oc} = K_d \times \frac{100}{F_{oc}} \quad (3)$$

Statistical analyses were conducted with the software SPSS 23.0 for Windows. Mann-Whitney U-tests were performed to evaluate differences between compounds. Statements regarding differences in this study are based on a significance level of $p < 0.05$. Linear regressions were established by Spearman test to detect correlations between matrices.

3. Results and discussion

3.1. Biosolid fortification

Previously, four biosolids were selected from different Spanish WWTPs and analyzed to characterize their PFASs and HFRs content (Navarro et al., 2016). These four biosolids were fortified by addition of PFOS, Deca BDE and DP to check the fate of these compounds in the soil and leachate and runoff water. Concentrations of the biosolids fortified are detailed in Table 1. Levels for PFOS ranged from 301 to 1070 ng/g d.w. , being $60 \pm 35\%$ of the nominal concentration added. PFOS was the predominant PFAS compound ($92 \pm 2\%$) but shorter-chain compounds as PFHxS ($4 \pm 1\%$) and PFBS ($<1\%$) were also detected. Concentrations detected for BDE-209 ranged from 8025 to 11518 ng/g d.w. ($98 \pm 15\%$ of the nominal amount added). The contribution of BDE-209 to the PBDE content was $97 \pm 1\%$ followed by BDE-206 ($2 \pm 1\%$) and BDE-207 ($<0.5\%$), which closely resembles to the composition of Deca-BDE commercial mixtures reported by La Guardia *et al.* ($94 \pm 4\%$ of BDE-209, $4 \pm 2\%$ of BDE-207 and $2 \pm 3\%$ of BDE-206) (La Guardia et al., 2006). DP (sum of *anti*- and *syn*- isomers) ranged from 196 to 264 ng/g d.w. ($87 \pm 11\%$ of the nominal concentration added). The fraction of *syn*-DP (f_{syn}) was

defined as the concentration of *syn*-DP divided by the total DP. f_{syn} value in biosolid (0.39 ± 0.02 ; mean \pm SD) was in accordance with the one reported for OxyChem's technical DP mixture ($f_{syn} = 0.35$) (Sverko et al., 2011; Tomy et al., 2007).

3.2. Biosolid application to soil

The presence of PFASs and HFRs in soils at the beginning ($t=0$ days) and the end ($t=293$ days) of the experiment has been detailed in Table 2 and S2. Concentration for PFOS ($t=0$) in the area of the top of the tray (< 0.5 m), where fortified biosolids were applied, was 0.11 ng/g d.w. in reference or control soil and ranged from 38.0 to 94.3 ng/g d.w. in amended soils with biosolids spiked. PFBS, PFHxS, PFOA and PFDA were frequently detected in soils in significant lower amount. PFASs concentrations in soils correlated linearly ($r=0.827$; $p<0.01$; Spearman test) with concentrations in biosolids. Although biosolids applied were spiked with PFOS, levels detected in soils are in accordance with data reported for biosolid amended soils: Sepulvado *et al.* detected PFOS in biosolid amended soil in the range from 5.5 to 483 ng/g d.w. (Sepulvado et al., 2011) and Washington *et al.* reported values from 0.6 to 408 ng/g d.w. (Washington et al., 2010). However, lower levels have been also found in biosolid amended soils (1.21 - 28.5 ng/g d.w.) (Wen et al., 2015). PFOS ($96 \pm 0.5\%$; mean \pm SD) was the predominant compound followed by PFHxS ($2.4 \pm 0.4\%$). Biosolid-amended soil/control soil ratios were calculated to assess the contribution of the biosolid application in soil (Table S3). Mean ratio value for PFOS was 498 ± 241 (mean \pm SD), showing a significant increase in the concentration in soil due to the amendment. This high ratio could simulate the cumulative effect of the repeated biosolid application rates in agricultural field conditions. Ratios for PFBS, PFHxS, PFOA and PFDA were not calculated individually because these compounds were not detected in control soils, but their presence in amended soils indicates the contribution due to the biosolid application. BDE-209 concentration in reference or control soil ($t=0$) was 2.1 ng/g d.w. and ranged from 216 to 815 ng/g d.w. in amended soils (Table 2). Higher levels of nonaBDEs were also detected in the amended soils: 10.5 ng/g d.w., mean for BDE-207 and 31 ng/g d.w. for BDE-206. Other PBDEs were also detected in lower concentrations (see Table S2). As expected BDE-209 was the predominant congener (91% to the total PBDE soil content), followed by BDE-206 (6%) and BDE-207 (2%), which as mentioned before, is in accordance with the composition of Deca-BDE commercial mixtures reported previously (La Guardia et al., 2006). As in the case of PFOS, although biosolids applied were spiked, BDE-209 levels obtained correspond well with concentrations found in biosolid amended soils in other studies: ranges from 25 to 655 ng/g d.w. (Eljarrat et al., 2008) and 0.02 - 2200 ng/g d.w. (Sellström et al., 2005). However, lower concentrations were detected in other cases: 86 ng/g d.w. (Gaylor et al., 2014) and 6.09 - 78.7

ng/g d.w. (Andrade et al., 2010). Biosolid-amended soil/control soil ratios for BDE-209 and BDE-206 ranged between 101 to 381 and 104 to 343, respectively, showing an important concentration increase in the soil due to the amendment. Although high ratio values were observed in our experiment, higher biosolid-amended soil/reference soil ratios have been reported for PBDEs in the range of 500-50000 (Gorgy et al., 2013). Ratios for BDE-28, -196, -197 and -207 could not be calculated due to their lack in control soils at the beginning of the experiment, but their presence in amended soils denotes the contribution of the amendment. A significant dose dependent tendency is observed by BDE-209, which presented a higher ratio for treatment-4 (T-4) followed by treatment-1 (T-1), treatment-2 (T-2) and treatment-3 (T-3), that are in consistency with the corresponding concentrations in spiked biosolids: B-4 (11518 ng/g d.w.) > B-1 (10208 ng/g d.w.) > B-2 (9580 ng/g d.w.) > B-3 (8025 ng/g d.w.). DP was not detected in reference soil, but its concentration increased after the amendment (16 ± 5.3 ng/g d.w.). f_{syn} values in soils were 0.30 ± 0.03 (mean \pm SD), very close to the value found in the biosolids (0.39 ± 0.02) and the value reported for technical DP mixture (Tomy et al., 2007).

3.3. Transfer from biosolid amended soil to leachate and runoff water

PFASs and HFRs were detected in leachate and runoff water (see Fig. 1 and Tables S4 and S5). Correlations between PFAS and HFR concentrations in leachate and runoff water and concentrations in soils were observed: PFASs ($r=0.590$; $p<0.01$; Spearman test), PBDEs ($r=0.724$; $p<0.01$) and DP ($r=0.640$; $p<0.05$). As expected, concentrations of PFOS, BDE-206, -207, -209, *anti*-DP and *syn*-DP were significantly higher ($p<0.05$; Mann-Whitney U-test) than the rest of the compounds. Levels of PFOS in the runoff water (136 ng/L, mean) were significantly higher ($p<0.05$; Mann-Whitney U-test) than those found in the leachate (11.6 ng/L, mean) in the four treatments and in all rainfall events. Besides, a notable decrease is observed from the first to the third rainfall event, indicating rainfall water could mobilize this soluble compound out of soil. BDE 209 concentrations in the suspended particulate matter of the runoff (165 ng/g d.w. or 77.5 normalized to ng/L) were higher than those found in leachate (43.8 ng/g d.w. or 4.1 ng/L), increasing significantly ($p<0.05$; Mann-Whitney U-test) from the first rainfall event (7, 9, 17 and 3 ng/g d.w. -T1, T2, T3 and T4-) to the third one (805, 300, 154, and 447 ng/g d.w. -T1, T2, T3 and T4-). The values in the third rainfall event were in accordance with those obtained in the amended soils at the beginning of the experiment (799, 301, 216 and 815 ng/g d.w.), suggesting the runoff water as preferential transport via of particles of the amended soils. In the case of DP, concentrations in the suspended particulate matter of the leachate samples (2.2 ng/g d.w. or 0.2 normalized to ng/L) decrease linearly ($r= -0.547$; $p<0.05$; Spearman test) from the first to the third rainfall event. However, concentrations detected in the runoff samples (8.2 ng/g d.w. or 6.2 ng/L) increase as the rain water mobilizes particulates from the top part of the trays, close to BDE

209 behaviour. f_{syn} values in leachate (0.25 ± 0.12 ; mean \pm SD) and runoff (0.28 ± 0.11) were lower than values obtained in soils (0.30 ± 0.03) and biosolids (0.39 ± 0.02). These findings are in accordance with f_{syn} values reported by Wu *et al.* in sediments (0.28) and suspended particles of sediments (0.16) (Wu *et al.*, 2010) and He *et al.* in water particulate phase (0.21) (He *et al.*, 2014) in aquatic environment. Besides, f_{syn} value in the suspended particulate matter of leachate and runoff water from the first rainfall event (0.31), is very close to the value found in soils and higher than those obtained in the second (0.24) and third (0.25) rainfall event, showing a decrease of *syn*-DP isomer as the rain water passes through soil. Although different aqueous solubilities have been reported for the two isomers, no information was given as to which isomer exhibited which solubility (Wu *et al.*, 2010). Our results evidence significant differences between *syn* and *anti*-DP isomers, suggesting higher water solubility for *syn*-DP isomer, which could be mobilized out of the soil and involve lower f_{syn} ratios in the particulate matter from leachate and runoff water.

Calculation of the amounts of pollutants removed from the soil through leachate and runoff was conducted (Table S6): loss from the soil trays through leachate amounted to $0.06 \pm 0.03\%$ (mean \pm SD) for PFOS, $0.004 \pm 0.003\%$ for BDE-209 and $0.002 \pm 0.001\%$ for DP, and through runoff $0.11 \pm 0.02\%$ for PFOS, $0.01 \pm 0.01\%$ for BDE-209 and $0.02 \pm 0.01\%$ for DP, showing a higher pollutant transfer via runoff. Ratios between pollutants (based in the amount removed from the soil) were calculated to show the behavior of the different compounds: Mean PFOS amount found in leachate was 5 and 13-fold higher than DP and BDE-209, respectively, and mean PFOS amount in runoff was 6 and 8-fold higher than DP and BDE-209. Mean DP amount compared with that found for BDE-209 was 3 and 1.4-fold higher in leachate and runoff, respectively. The amounts removed from the soil and the ratios between pollutants verify that PFOS is much more quickly transferred from the soil to leachate and runoff water through precipitation than are BDE-209 and DP. The total mass distribution calculated in water samples showed higher total compound content in runoff samples than leachate: $91 \pm 2\%$ for PFOS, $76 \pm 17\%$ for BDE-209 and $83 \pm 14\%$ for DP, which support the results commented above.

3.4. Comparison of PFOS, BDE-209 and DP mobility behavior

The distribution and fate in various environmental media and compartments is strongly influenced by the physicochemical properties of the compounds themselves. The octanol-water partition coefficient (K_{ow}) has been considered as a determinant factor in runoff transport potential of some organic compound (Sabourin *et al.*, 2009). In that study, compounds with lower partition coefficients showed higher transport potential to runoff water. Considering the log K_{ow} values (calculated by EPISuite 4.1) of PFOS (4.49), BDE-209 (12.11) and DP (11.27), higher mobility or availability for water transport is expected for PFOS. Chemical species with high

K_{ow} , such as PBDEs or DP, can have greater affinity to be sorbed on the soil rather than desorbing and partitioning into the water (Gorgy et al., 2013). Besides, the organic carbon-water partition coefficient (K_{oc}) provides a good indication of the likelihood of leaching through soil. In general, compounds with higher K_{oc} values tend to adsorb more strongly onto organic carbon, whilst those with lower K_{oc} values are more readily leached (Wilson et al., 1996). K_{oc} , expressed as logarithmic value and calculated by EPISuite 4.1, for PFOS (3.41) indicate a higher leaching mobility through soil than BDE-209 (7.68) and DP (9.78). Other different environmental partitioning indexes used to evaluate the leaching tendency of organic contaminants have been applied to PFOS, BDE-209 and DP to identify possible differences in partitioning trends (see Table S7). One model used to assess the potential degree of groundwater and river water contamination was the leaching potential (L_p) defined by Laskowski *et al.* (Eq. 1) (Laskowski et al., 1982). The L_p values obtained were 4.7×10^{-5} for PFOS, 9.5×10^{-10} for BDE-209 and 3.0×10^{-11} for DP, showing a higher leaching potential for PFOS, and similar behavior for BDE-209 and DP whose L_p values were comparable. The second model used establishes two leaching potential (leacher and non-leacher) based on sorption and persistence properties in soil and defined by a Groundwater Ubiquity Score (GUS) (Eq. 2). In this case, GUS values calculated were 2 for PFOS, -13.11 (BDE-209) and -25.88 (DP). According to the GUS index, PFOS would be considered a transitional compound, with an intermediate mobility ($1.8 > \text{GUS} > 2.8$), and BDE-209 and DP non-leachers ($\text{GUS} < 1.8$). In general, this predicted behavior has been corroborated with our results, where PFOS showed the highest mobility through the soil via leachate and runoff water. In fact, the field-based sorption coefficient (K_{oc}) was also calculated considering the concentrations in soils and water (leachate and runoff) detected and the organic carbon content of the soils (Eq. 3). K_{oc} values calculated with our data were lower for PFOS ($\log K_{oc} = 4.59 \pm 0.61$) than BDE-209 ($\log K_{oc} = 5.82 \pm 0.68$) and DP ($\log K_{oc} = 5.61 \pm 0.83$), indicating that PFOS are more easily desorbed from soil and more easily mobilized via leachate and runoff water than BDE-209 and DP (Table S8). PFOS K_{oc} values from our data are higher than value calculated by EPISuite (3.41) and higher than experimental $\log K_{oc}$ values published in the literature for soils (2.9; Milinovic et al., 2015), soils and sediments (3.0 ± 0.7 ; Zareitalabad et al., 2013) and sewage sludge (2.6-2.9; Milinovic et al., 2016). However, values obtained are very close to those reported for PFOS in field situations: 4.2 (Zareitalabad et al., 2013) and 3.7 ± 0.2 (Labadie and Chevreuil, 2011) for sediments, 4.3 for sewage sludge (Zareitalabad et al., 2013) and 4.8 ± 0.1 for suspended particulate matter (Ahrens et al., 2010). BDE-209 K_{oc} values from our data are lower than the value calculated by EPISuite (7.68) but very close to values (6.3) previously reported (USEPA, 2008).

Table 1

Concentrations (ng/g d.w.) of PFASs and HFRs in biosolid fortified by the addition of PFOS (~1 mg PFOS/kg biosolid), Deca BDE (~10 mg/kg) and DP (~0.26 mg/kg).

	B-1	B-2	B-3	B-4
PFBS	N.D.	N.D.	21.6	2.94
PFHxS	14.6	34.9	38.0	18.8
PFOS	301	672	1070	374
PFPeA	N.D.	6.64	N.D.	N.D.
PFHxA	N.D.	10.3	N.D.	N.D.
PFHpA	N.D.	N.D.	N.D.	2.93
PFOA	5.63	8.19	11.5	3.15
PFNA	N.D.	1.38	N.D.	0.51
PFDA	N.D.	12.1	10.2	1.04
PFUdA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFDoA	N.D.	1.40	N.D.	N.D.
Σ PFASs	321	746	1151	403
BDE-17	0.01	0.12	0.11	0.01
BDE-28	0.03	0.26	0.47	0.28
BDE-47	2.13	10.4	11.1	5.38
BDE-66	0.03	0.18	0.25	0.27
BDE-85	0.10	0.42	0.50	0.29
BDE-99	2.84	14.7	14.4	8.60
BDE-100	0.62	2.86	3.17	1.67
BDE-138	N.D.	N.D.	N.D.	0.14
BDE-153	0.84	1.80	2.31	1.85
BDE-154	0.41	1.55	1.63	0.95
BDE-183	1.75	2.27	2.44	3.22
BDE-196	0.85	1.91	2.19	2.00
BDE-197	0.69	0.98	1.77	1.10
BDE-206	151	338	150	185
BDE-207	37.8	56.5	44.8	34.1
BDE-209	10207	9579	8025	11518
Σ PBDEs	10407	10012	8261	11762
DBDPE	13.5	133	93.4	152
anti-DP	123	153	146	129
syn-DP	72.8	111	86	81.6
Σ DP	196	264	232	210
<i>f_{syn}</i>	0.37	0.42	0.37	0.39
Dec 602	0.005	0.01	0.01	0.003
Dec 603	0.02	N.D.	N.D.	0.09

N.D.: not detected.

PFDS, PFBA, PFTeDA, PFTeDA, PFHxDA, PFODA, FOSA, *N*-MeFOSA, *N*-EtFOSA, BDE-77, -119, -156, -184, -191, Dec 604, CP and Mirex were not detected in any sample.

Table 2

Concentrations (ng/g d.w.) of PFASs and HFRs in soils at the beginning (t=0 days) and the end (t=293 days) of the experiment.

	CONTROL			T-1			T-2			T-3			T-4		
	t=0	t=final		t=0	t=final		t=0	t=final		t=0	t=final		t=0	t=final	
	<0.5 m	<0.5 m	0.5-2.5 m	<0.5 m	<0.5 m	0.5-2.5 m	<0.5 m	<0.5 m	0.5-2.5 m	<0.5 m	<0.5 m	0.5-2.5 m	<0.5 m	<0.5 m	0.5-2.5 m
PFBS	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.35	0.20	N.D.
PFHxS	N.D.	N.D.	N.D.	0.97	2.70	N.D.	1.37	0.72	N.D.	0.82	0.27	N.D.	2.31	1.79	0.11
PFOS	0.11	0.16	0.29	41.8	84.6	0.59	45.0	36.1	0.41	38.0	30.1	0.33	94.3	47.2	0.49
Σ PFASs	0.11	0.16	0.29	42.8	87.3	0.59	46.3	36.8	0.41	38.8	30.3	0.33	97.0	49.2	0.6
BDE-206	0.19	0.08	0.06	19.9	22.9	0.12	20.4	9.33	0.23	19.5	3.41	0.08	64.2	16.1	0.23
BDE-207	N.D.	0.09	0.06	8.02	6.33	0.10	7.91	3.19	0.27	4.12	1.63	0.09	21.8	5.82	0.19
BDE-209	2.14	1.97	0.84	799	725	4.19	302	235	8.06	216	144	2.37	815	589	5.07
Σ PBDEs	2.55	2.36	1.12	828	755	4.68	332	249	8.84	241	150	2.81	921	613	5.75
anti-DP	N.D.	N.D.	N.D.	11.5	13.5	0.03	9.58	6.54	N.D.	8.04	5.37	0.03	16.8	16.0	N.D.
syn-DP	N.D.	N.D.	N.D.	4.73	5.82	0.01	3.56	2.92	N.D.	4.34	2.30	0.01	7.09	7.29	N.D.
Σ DP	N.D.	N.D.	N.D.	16.3	19.3	0.04	13.1	9.46	N.D.	12.4	7.67	0.04	23.9	23.3	N.D.
<i>f_{syn}</i>	-	-	-	0.29	0.30	0.31	0.27	0.31	-	0.35	0.30	0.36	0.30	0.31	-

N.D. : not detected. <0.5 m= area of the top of the tray where fortified biosolid was applied; 0.5-2.5 m= remaining surface of the tray without amendment.

Σ PFASs: sum of PFBS, PFHxS, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA and PFDoA.

Σ PBDEs: sum of BDE-17, -28, -47, -66, -99, -100, -153, -154, -156, -183, -184, -196, -197, -206, -207, and -209.

For clarity, only the most representative compounds have been shown (concentrations of the rest of the compounds have been detailed in Supplementary data).

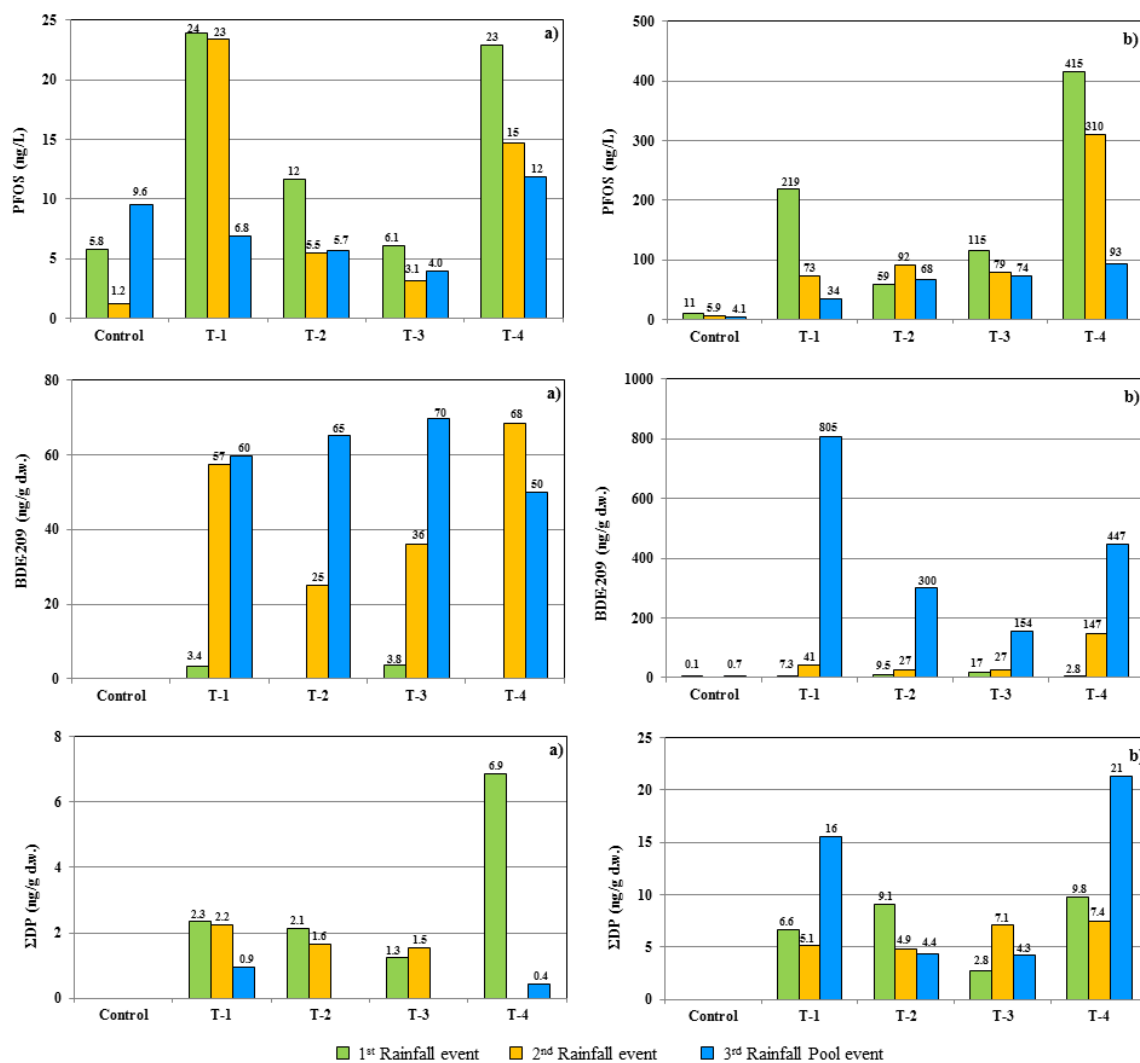


Fig. 1. Concentrations of PFOS (ng/L; liquide phase), BDE 209 (ng/g d.w.; particulate matter) and DP (ng/g d.w.; particulate matter) in leachate (a) and runoff (b) water samples.

4. Conclusions

The study of emerging pollutants (PFASs and HFRs), in biosolids, biosolids-amended soils, leachate and runoff water demonstrates the mobility and transfer of these pollutants to the different environmental compartments due to the application of biosolids in agricultural soils. To the best of our knowledge, this study is the first to compare, under the same experimental conditions, the migration behavior of PFOS, BDE-209 and DP from biosolid amended soil to leachate and runoff in a semi-field situation. The highest mobility potential through the soil via runoff and leachate water was showed for PFOS. Due to the higher levels obtained for PFOS, BDE 209 and DP in runoff water than in the leachate, the runoff transport phenomena could be the preferential transfer route of these pollutants among different environmental compartments.

Acknowledgements

The present work has been funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project numbers CTM2010-19779-C02-01 and CTM2010-19779-C02-02).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found at

References

- Ahrens, L., Taniyasu, S., Yeung, L.W.Y., Yamashita, N., Lam, P.K.S., Ebinghaus, R., 2010. Distribution of polyfluoroalkyl compounds in water, suspended particulate matter and sediment from Tokyo Bay, Japan, *Chemosphere* 79, 266-272.
- Andrade, N.A., McConnell, L.L., Torrents, A., Ramirez, M., 2010. Persistence of polybrominated diphenyl ethers in agricultural soils after biosolids applications, *J. Agric. Food Chem.* 58, 3077-3084.
- Armitage, J.M., MacLeod, M., Cousins, I.T., 2009. Comparative assessment of the global fate and transport pathways of long-chain perfluorocarboxylic acids (PFCAs) and perfluorocarboxylates (PFCs) emitted from direct sources, *Environ. Sci. Technol.* 43, 5830–5836.
- Clarke, B.O., Smith, S.R., 2011. Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ. Int.* 37, 226-247.
- Cheng, Z., Wang, Y., Wang, S., Luo, C., Li, J., Chaemfa, C., Jiang, H., Zhang, G., 2014. The influence of land use on the concentration and vertical distribution of PBDEs in soils of an e-waste recycling region of South China, *Environ. Pollut.* 191, 126-131.

- De la Torre, A., Sverko, E., Alae, M., Martínez, M.A., 2011a. Concentrations and sources of dechlorane plus in sewage sludge, *Chemosphere* 82, 692-697.
- De la Torre, A., Alonso, E., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2011b. Sources and behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in Spanish sewage sludge, *Waste Manage.* 31, 1277-1284.
- De la Torre, A., Alonso, M.B., Martínez, M.A., Sanz, P., Shen, L., Reiner, E.J., Lailson-Brito, J., Torres, J.P.M., Bertozzi, C., Marigo, J., Barbosa, L., Cremer, M., Secchi, E., Malm, O., Eljarrat, E., Barceló, D., 2012. Dechlorane-related compounds in Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from Southeastern and Southern Coast of Brazil, *Environ. Sci. Technol.* 46, 12364-12372.
- De Wit, C.A., 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46, 583-624.
- De Wit, C.A., Herzke, D., Vorkamp, K., 2010. Brominated flame retardants in the Arctic environment - trends and new candidates, *Sci. Tot. Environ.* 408, 2885-2918.
- Eljarrat, E., Marsh, G., Labandeira, A., Barceló, D., 2008. Effect of sewage sludges contaminated with polybrominated diphenylethers on agricultural soils, *Chemosphere* 71, 1079-1086.
- Eschauzier, C., Raat, K.J., Stuyfzand, P.J., De Voogt, P., 2013. Perfluorinated alkylated acids in groundwater and drinking water: identification, origin and mobility, *Sci. Tot. Environ.* 458-460, 477-485.
- Gaylor, M.O., Mears, G.L., Harvey, E., La Guardia, M.J., Hale, R.C., 2014. Polybrominated diphenyl ether accumulation in an agricultural soil ecosystem receiving wastewater sludge amendments, *Environ. Sci. Technol.* 48, 7034-7043.
- Gellrich, V., Stahl, T., Knepper, T.P., 2012. Behavior of perfluorinated compounds in soils during leaching experiments, *Chemosphere* 87, 1052-1056.
- Giesy, J.P., Kannan, K., 2001. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife, *Environ. Sci. Technol.* 35, 1339-1342.
- Gorgy, T., Li, L.Y., Grace, J.R., Ikonou, M.G., 2010. Polybrominated diphenyl ether leachability from biosolids and their partitioning characteristics in the leachate, *Water Air Soil Pollut.* 209, 109-121.
- Gorgy, T., Li, L.Y., Grace, J.R., Ikonou, M.G., 2011. Polybrominated diphenyl ethers mobility in biosolids-amended soils using leaching column tests, *Water Air Soil Pollut.* 222, 77-90.
- Gorgy, T., Li, L.Y., Grace, J.R., Ikonou, M.G., 2013. Migration of polybrominated diphenyl ethers in biosolids-amended soil, *Environ. Pollut.* 124, 124-130.
- Gottschall, N., Topp, E., Edwards, M., Russell, P., Payne, M., Kleywegt, S., Curnoe, W., Lapen, D.R., 2010. Polybrominated diphenyl ethers, perfluorinated alkylated substances, and

- metals in tile drainage and groundwater following applications of municipal biosolids to agricultural fields, *Sci. Tot. Environ.* 408, 873-883.
- Gustafson, D.I., 1989. Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability, *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 339-357.
- He, M., Luo, X., Wu, J., Chen, S., Wei, S., Mai, B., 2014. Isomers of dechlorane plus in an aquatic environment in a highly industrialized area in Southern China: Spatial and vertical distribution, phase partition, and bioaccumulation, *Sci. Total Environ.* 481, 1-6.
- Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2006. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review, *Environ. Sci. Technol.* 40, 3463-3473.
- Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillmann, G., Kumar, K.S., Loganathan, B.G., Mohd, M.A., Olivero, J., van Wouwe, N., Yang, J.H., Aldous, K.M., 2004. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries, *Environ. Sci. Technol.* 38, 4489-4495.
- Kannan, K., 2011. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances: current and future perspectives, *Environ. Chem.* 8, 333-338.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., 2006. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used Penta- Octa and Deca-PBDE technical flame retardant mixtures, *Environ. Sci. Technol.* 40, 6247-6254.
- Labadie, P., Chevreuil, M., 2011. Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France), *Environ. Pollut.* 159, 391-397.
- Laskowski, D.A., Goring, C.A.I., McCall, P.J., Swann, R.L., 1982. Terrestrial environment, in: R.A. Conway (Ed.), *Environment Risk Analysis for Chemicals*, Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp. 198-240.
- Law, R.J., Alae, M., Allchin, C.R., Boon, J.P., Lebeuf, M., Lepom, P., Stern, G.A., 2003. Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife. *Environ. Int.* 29, 757-770.
- Lindstrom, A.B., Strynar, M.J., Delinsky, A.D., Nakayama, S.F., McMillan, L., Libelo, E.L., Neill, M., Thomas, L., 2011. Application of WWTP biosolids and resulting perfluorinated compound contamination of surface and well water in Decatur, Alabama, USA, *Environ. Sci. Technol.* 45, 8015-8021.
- Martellini, T., Jones, K.C., Sweetman, A., Giannoni, M., Pieri, F., Cincinelli, A., 2012. The contribution of wastewater treatment plants to PBDEs in ambient air, *Environ. Pollut.* 169, 242-247.
- Milinic, J., Lacorte, S., Vidal, M., Rigol, A., 2015. Sorption behaviour of perfluoroalkyl substances in soils, *Sci. Total Environ.* 511, 63-71.
- Milinic, J., Lacorte, S., Rigol, A., Vidal, M., 2016. Sorption of perfluoroalkyl substances in sewage sludge, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8339-8348.

- Navarro, I., Sanz, P., Martínez, M.A., 2011. Analysis of perfluorinated alkyl substances in Spanish sewage sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1277-1286.
- Navarro, I., De la Torre, A., Sanz, P., Pro, J., Carbonell, G., Martínez, M.A., 2016. Bioaccumulation of emerging organic compounds (perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants) by earthworm in biosolid amended soils, *Environ. Res.* 149, 32-39.
- Papa, E., Castiglioni, S., Gramatica, P., Nikolayenko, V., Kayumov, O., Calamaria, D., 2004. Screening the leaching tendency of pesticides applied in the Amu Darya Basin (Uzbekistan), *Water Res.* 38, 3485-3494.
- Perkola, N., Sainio, P., 2013. Survey of perfluorinated alkyl acids in Finnish effluents, storm water, landfill leachate and sludge, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 7979-7987.
- Sabourin, L., Beck, A., Duenk, P.W., Kleywegt, S., Lapen, D.R., Li, H., Metcalfe, C.D., Payne, M., Topp, E., 2009. Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of dewatered municipal biosolids to an agricultural field, *Sci. Total Environ.* 407, 4596-4604.
- Sellström, U., De Wit, C.A., Lundgren, L., Tysklind, M., 2005. Effect of sewage-sludge application on concentrations of higher-brominated diphenyl ethers in soils and earthworms, *Environ. Sci. Technol.* 39, 9064-9070.
- Sepulvado, J.G., Blaine, A.C., Hundal, L.S., Higgins, C.P., 2011. Occurrence and fate of perfluorochemicals in soil following the land application of municipal biosolids, *Environ. Sci. Technol.* 45, 8106-8112.
- Stahl, T., Riebe, R.A., Falk, S., Failing, K., Brunn, H., 2013. Long-term lysimeter experiment to investigate the leaching of perfluoroalkyl substances (PFASs) and the carry-over from soil to plants: results of a pilot study, *J. Agric. Food Chem.* 61, 1784-1793.
- Sverko, E., Tomy, G.T., Reiner, E.J., Li, Y., McCarry, B.E., Arnot, J.A., Law, R.J., Hites, R.A., 2011. Dechlorane Plus and related compounds in the environment: A review, *Environ. Sci. Technol.* 45, 5088-5098.
- Tomy, G.T., Pleskach, K., Ismail, N., Whittle, D.M., Helm, P.A., Sverko, E., Zaruk, D., Marvin, C.H., 2007. Isomers of dechlorane plus in Lake Winnipeg and Lake Ontario food webs, *Environ. Sci. Technol.* 41, 2249-2254.
- UNEP, Risk profile on perfluorooctane sulfonate, 2006. Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its second meeting, UNEP/POPS/POPRC.2/17/Add.5
- USEPA, Toxicological review of decabromodiphenyl ether (BDE-209), 2008. EPA/635/R-07/008F.
- Washington, J.W., Yoo, H., Ellington, J.J., Jenkins, T.M., Libelo, E.L., 2010. Concentrations, distribution and persistence of perfluoroalkylates in sludge-applied soils near Decatur, Alabama, USA, *Environ. Sci. Technol.* 44, 8390-8396.

- Wen, B., Zhang, H., Li, L., Hu, X., Liu, Y., Shan, X., Zhang, S., 2015. Bioavailability of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in biosolids-amended soils to earthworms (*Eisenia fetida*), Chemosphere 118, 361-366.
- Wilson, S.C., Duarte-Davidson, R., Jones, K.C., 1996. Screening the environmental fate of organic contaminants in sewage sludges applied to agricultural soils: 1. The potential for downward movement to groundwaters, Sci. Total Environ. 185, 45-57.
- Wu, J., Zhang, Y., Luo, X., Wang, J., Chen, S., Guan, Y., Mai, B., 2010. Isomer-Specific bioaccumulation and trophic transfer of dechlorane plus in the freshwater food web from a highly contaminated site, South China, Environ. Sci. Technol. 44, 606-611.
- Xian, Q., Siddique, S., Li, T., Feng, Y., Takser, L., Zhu, J., 2011. Sources and environmental behavior of dechlorane plus. A review, Environ Int. 37, 1273-1284.
- Zareitalabad, P., Siemens, J., Hamer, M., Amelung, W., 2013. Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in surface waters, sediments, soils and wastewater - A review on concentrations and distribution coefficients, Chemosphere 91, 725-732.

Supplementary material

Title

Transfer of PFOS, BDE 209 and DP from biosolid amended soils to leachate and runoff water

Authors

Irene Navarro^{a,*}, Adrián de la Torre^a, Paloma Sanz^a, Miguel Ángel Porcel^b, Gregoria Carbonell^b,
María de los Ángeles Martínez^a

^aGroup of Persistent Organic Pollutants. Department of Environment, CIEMAT, Avda. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain.

^bLaboratory for Ecotoxicology. Department of the Environment, INIA, Crta. La Coruña km 7.5, 28040 Madrid. Spain.

*Corresponding author: Tel: +34 91 346 61 43. Fax: +34 91 346 62 69. E-mail address: i.navarro@ciemat.es. (I. Navarro).

Content:

S.1. Materials and Methods

Table S1.- Analytical standards used in this study.

Table S2.- Concentrations (ng/g d.w.) of PFASs and HFRs in soils.

Table S3.- Biosolid-amended soil/control soil ratios for PFASs and HFRs.

Table S4. Concentrations (ng/L) of PFASs in leachate and runoff water in the rainfall events.

Table S5. Concentrations (ng/g d.w.) of HFRs in particulate matter of leachate and runoff water in the rainfall events.

Table S6. Calculation of the amount (%) of PFOS, BDE-209 and DP removed from soil through leachate and runoff in the different rainfall events.

Table S7.- Physicochemical properties of PFOS, BDE-209 and DP. Leaching potential (L_p) and the groundwater ubiquity score (GUS).

Table S8. Calculation (mean \pm SD) of the field-based K_d and K_{oc} distribution coefficients of PFOS, BDE-209 and DP between water and soil samples analyzed.

S.1. Materials and Methods

S1.1. Standards and reagents

Chemicals used as copper fine powder, anhydrous sodium sulphate, sulphuric acid (95–97%) and solvents (dichloromethane -DCM-, hexane, toluene and ethyl acetate) for organic trace analysis were provided from Merck (Darmstadt, Germany). Siliceous earth extrapure, sodium acetate, ammonium acetate, acetic acid, ammonium hydroxide, acetonitrile, methanol, were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain).

Oasis WAX cartridges (500 mg, 6 mL) SPE were purchased from Waters (Milford, MA, USA) and EnviCarb cartridges (500 mg, 6 mL) SPE from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)

The analytical standards used in this study are detailed in Table S1.

Table S1.- Analytical standards used in this study.

Native Compounds	Labelled Compounds			Supplier
	Cleanup	Internal	Calibration	
PFAC-MXB				
PFBS (perfluorobutanesulfonate)				
PFHxS (perfluorohexanesulfonate)				
PFOS (perfluorooctanesulfonate)				
PFDS (perfluorodecanesulfonate)				
PFBA (perfluorobutanoic acid)				
PFPeA (perfluoropentanoic acid)				
PFHxA (perfluorohexanoic acid)				
PFHpA (perfluoroheptanoic acid)	MPFAC-MXA	¹³ C ₉ -PFNA		Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canada)
PFOA (perfluorooctanoic acid)				
PFNA (perfluorononanoic acid)				
PFDA (perfluorodecanoic acid)				
PFUdA (perfluoroundecanoic acid)				
PFDoA (perfluorododecanoic acid)				
PFTTrDA (perfluorotridecanoic acid)				
PFTeDA (perfluorotetradecanoic acid)				
PFHxDA (perfluorohexadecanoic acid)				
PFODA (perfluorooctadecanoic acid)				
FOSA (perfluorooctanesulfonamide)	MPFAC-MXA	¹³ C ₉ -PFNA		Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canada)

N-MeFOSA (N-methyl perfluorooctanesulfonamide)	N-d₃-MeFOSA	¹³C₉-PFNA		Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canada)
N-EtFOSA (N-ethyl perfluorooctanesulfonamide)	N-d₅-EtFOSA	¹³C₉-PFNA		Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canada)
PBDEs (IUPAC congener numbers: BDE-17, -28, -47, -66, -77, -85, -99, -100, -119, -138, -153, -154, -156, -183, -184, -191, -196, -197, -206, -207, -209)	MBDE-MXE	BDE-CVS-EISS	BDE-CVS-E	Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canada)
DBDPE (decabromodiphenyl ethane)	MDBDPE	BDE-CVS-EISS		Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canada)
<i>anti</i>-DP^a	¹³C₁₀-<i>anti</i>-DP^a	BDE-CVS-EISS^b		^a Cambridge Isotope Laboratories. Inc. (Andover, MA, USA)
<i>syn</i>-DP^a	¹³C₁₀-<i>syn</i>-DP^a	BDE-CVS-EISS^b		^b Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canada)
Dec 602 (CAS# 31107-44-5) ^c	¹³C₁₀-<i>anti</i>-DP^a	BDE-CVS-EISS^b		^a Cambridge Isotope Laboratories. Inc. (Andover, MA, USA)
Dec 603 (CAS# 13560-91-4) ^c	¹³C₁₀-<i>anti</i>-DP^a	BDE-CVS-EISS^b		^b Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canada)
Dec 604 (CAS# 34571-16-9) ^c	¹³C₁₀-<i>anti</i>-DP^a	BDE-CVS-EISS^b		^c Toronto Research Chemical Inc. (Toronto, ON, Canada)

Table S2. Concentrations (ng/g d.w.) of PFASs and HFRs in soils at the beginning (t=0 days) and the end (t=293 days) of the experiment.

	CONTROL			T-1			T-2			T-3			T-4		
	t=0	t=final		t=0	t=final		t=0	t=final		t=0	t=final		t=0	t=final	
	<0.5 m	<0.5 m	0.5-2.5 m	<0.5 m	<0.5 m	0.5-2.5 m	<0.5 m	<0.5 m	0.5-2.5 m	<0.5 m	<0.5 m	0.5-2.5 m	<0.5 m	<0.5 m	0.5-2.5 m
PFBS	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.35	0.20	N.D.
PFHxS	N.D.	N.D.	N.D.	0.97	2.70	N.D.	1.37	0.72	N.D.	0.82	0.27	N.D.	2.31	1.79	0.11
PFOS	0.11	0.16	0.29	41.81	84.65	0.59	44.96	36.12	0.41	37.98	30.06	0.33	94.32	47.24	0.49
PFHxA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.28	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFHpA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.36	N.D.
PFOA	N.D.	N.D.	N.D.	0.22	1.13	N.D.	0.15	4.54	0.16	0.27	0.36	0.06	0.33	0.43	N.D.
PFNA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.49	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFDA	N.D.	0.10	N.D.	N.D.	0.79	N.D.	0.40	2.56	0.13	0.27	0.42	0.09	0.15	0.29	N.D.
PFUdA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.14	N.D.	N.D.	0.34	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFDoA	N.D.	N.D.	N.D.	0.12	0.23	N.D.	N.D.	0.40	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Σ PFASs	0.11	0.26	0.29	43.12	89.64	0.59	46.88	46.45	0.7	39.34	31.11	0.48	97.46	50.31	0.6
BDE-17	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.001	N.D.	N.D.	0.002	N.D.	N.D.	0.001	N.D.	N.D.	0.002	N.D.
BDE-28	N.D.	0.002	0.002	0.002	0.005	0.001	0.01	0.01	0.002	0.01	0.01	0.002	0.02	0.02	0.001
BDE-47	0.06	0.03	0.03	0.20	0.18	0.04	0.41	0.28	0.04	0.22	0.19	0.03	0.56	0.46	0.04
BDE-66	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.001	N.D.	N.D.	0.001	N.D.	N.D.	0.003	N.D.	N.D.	0.002
BDE-99	0.05	0.06	0.04	0.24	0.30	0.10	0.54	0.43	0.10	0.33	0.30	0.10	0.75	0.72	0.05
BDE-100	0.01	0.01	0.01	0.05	0.06	0.01	0.10	0.08	0.01	0.05	0.06	0.01	0.14	0.15	0.01
BDE-153	0.02	0.01	0.01	0.05	0.06	0.01	0.09	0.06	0.01	0.05	0.06	0.02	1.09	0.15	0.02
BDE-154	0.01	0.01	0.01	0.04	0.06	0.01	0.08	0.05	0.01	0.04	0.05	0.01	0.19	0.09	0.01

BDE-156	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BDE-183	0.03	0.02	0.02	0.06	0.06	0.02	0.11	0.10	0.02	0.09	0.13	0.02	10.05	0.30	0.03
BDE-184	0.04	0.003	N.D.	N.D.	0.004	0.004	N.D.	0.01	0.004	N.D.	0.03	0.004	N.D.	N.D.	0.004
BDE-196	N.D.	0.04	0.02	0.09	0.08	0.04	0.11	0.15	0.04	0.19	0.20	0.03	2.66	0.08	0.05
BDE-197	N.D.	0.03	0.02	0.05	0.03	0.03	0.06	0.08	0.04	0.07	0.22	0.03	4.25	0.06	0.04
BDE-206	0.19	0.08	0.06	19.92	22.92	0.12	20.42	9.33	0.23	19.54	3.41	0.08	64.19	16.10	0.23
BDE-207	N.D.	0.09	0.06	8.02	6.33	0.10	7.91	3.19	0.27	4.12	1.63	0.09	21.82	5.82	0.19
BDE-209	2.14	1.97	0.84	799.39	725.34	4.19	301.67	234.84	8.06	216.00	143.85	2.37	815.19	588.76	5.07
Σ PBDEs	2.55	2.36	1.12	828.10	755.42	4.68	331.51	248.60	8.84	240.70	150.14	2.81	920.91	612.71	5.75
DBDPE	0.56	0.30	0.28	1.14	0.89	0.96	3.46	0.13	2.15	1.50	1.17	0.95	10.78	3.73	6.38
anti-DP	N.D.	N.D.	N.D.	11.56	13.49	0.03	9.58	6.54	N.D.	8.04	5.37	0.03	16.80	16.02	N.D.
syn-DP	N.D.	N.D.	N.D.	4.73	5.82	0.01	3.56	2.92	N.D.	4.34	2.30	0.01	7.09	7.29	N.D.
Σ DP	N.D.	N.D.	N.D.	16.29	19.31	0.04	13.14	9.46	N.D.	12.38	7.67	0.04	23.88	23.31	N.D.
f_{syn}	-	-	-	0.29	0.30	0.31	0.27	0.31	-	0.35	0.30	0.36	0.30	0.31	-
Dec 602	N.D.	N.D.	N.D.	0.001	0.002	N.D.	0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.04	N.D.	N.D.
Dec 603	N.D.	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	0.005	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.
CP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. : not detected. <0.5 m= area of the top of the tray where fortified biosolid was applied; 0.5-2.5 m= remaining surface of the tray without amendment.

PFDS, PFBA, PFPeA, PFTTrDA, PFTeDA, PFHxDA, PFODA, FOSA, N-MeFOSA, N-EtFOSA, BDE-77, -85, -119, -138, -191, Dec 604 and Mirex were not detected in any soil sample.

Table S3. Biosolid-amended soil/control soil ratios calculated at the beginning of the experiment (t=0) for PFASs and HFRs.

	T-1	T-2	T-3	T-4
PFOS	380	409	345	857
ΣPFASs	392	426	358	886
BDE 47	3.24	6.77	3.65	9.16
BDE 99	5.09	11.35	7.03	15.83
BDE 100	4.02	8.69	3.90	11.58
BDE 153	2.95	5.63	3.28	67.3
BDE 154	2.85	5.68	3.27	14.3
BDE 183	1.97	3.72	2.90	340
BDE 206	106	109	104	343
BDE 209	373	141	101	381
ΣPBDEs	325	130	94.4	361
DBDPE	2.03	6.17	2.68	19.2

ΣPFASs: sum of PFBS, PFHxS, PFOS, PFOA, PFDA and PFDoA.

ΣPBDEs: sum of BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183, -184, -196, -197, -206, -207 and -209.

Biosolid-amended soil/control soil ratios were not calculated individually for PFBS, PFHxS, PFOA, PFDA, PFDoA, BDE-28, -196, -197, -207, *anti*-DP, *syn*-DP, Dec 602 and Dec 603 because these compounds were not detected in control soil.

Table S4. Concentrations (ng/L) of PFASs in leachate and runoff water in the rainfall events.

	CONTROL		T-1		T-2		T-3		T-4	
	Leachate	Runoff	Leachate	Runoff	Leachate	Runoff	Leachate	Runoff	Leachate	Runoff
1st event										
PFBS	13.51	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFHxS	N.D.	N.D.	N.D.	12.54	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.38
PFOS	5.80	10.76	23.87	219.33	11.66	59.16	6.07	115.29	22.85	415.13
PFOA	22.45	7.06	28.56	8.46	23.78	7.82	25.86	6.03	22.11	8.21
PFNA	5.89	7.36	6.71	5.73	5.47	7.60	7.95	6.00	2.96	4.18
PFDA	N.D.	8.33	N.D.	10.98	N.D.	14.82	ND	10.42	N.D.	10.46
PFUdA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.08	ND	1.93	N.D.	1.33
PFDoA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.49	ND	0.59	N.D.	0.33
Σ PFASs	47.65	33.51	59.14	257.04	40.91	92.97	39.88	140.26	47.92	446.02
2nd event										
PFBS	6.56	N.D.	14.00	N.D.	13.69	N.D.	15.75	N.D.	52.57	N.D.
PFHxS	N.D.	N.D.	26.84	N.D.	18.26	N.D.	25.63	N.D.	53.37	6.17
PFOS	1.16	5.88	23.42	72.79	5.48	91.96	3.12	79.03	14.72	310.25
PFOA	16.70	2.35	27.14	9.84	23.43	9.99	27.47	2.49	21.53	3.84
PFNA	N.D.	1.90	2.45	4.28	1.62	5.25	1.47	1.25	1.50	1.32
PFDA	0.33	2.36	1.24	15.40	0.40	21.80	0.37	3.66	0.26	5.51
PFUdA	N.D.	N.D.	N.D.	2.15	N.D.	3.44	N.D.	0.47	N.D.	0.86
PFDoA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.61	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Σ PFASs	24.75	12.49	95.09	104.46	62.88	133.05	73.81	86.90	143.95	327.95
3rd event										
PFBS	4.42	N.D.	12.74	N.D.	5.90	N.D.	10.74	N.D.	34.12	N.D.
PFHxS	2.64	N.D.	50.12	3.45	34.87	N.D.	47.35	N.D.	81.66	N.D.
PFOS	9.56	4.13	6.84	33.77	5.70	67.62	3.98	73.65	11.80	93.21

PFOA	10.84	3.80	15.62	5.13	63.59	15.42	51.00	8.31	22.48	5.08
PFNA	N.D.	2.41	N.D.	2.51	1.44	8.56	N.D.	6.66	N.D.	3.69
PFDA	N.D.	1.43	N.D.	1.55	0.97	8.04	N.D.	3.96	N.D.	1.90
PFUdA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.97	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Σ PFASs	27.46	11.77	85.32	46.41	112.47	100.61	113.07	92.58	150.06	103.88

N.D.: not detected.

PFDS, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFTTrDA, PFTeDA, PFHxDA, PFODA, FOSA; N-MeFOSA and N-EtFOSA were not detected in any sample.

Table S5. Concentrations (ng/g d.w.) of HFRs in particulate matter of leachate and runoff water in the rainfall events.

	CONTROL		T-1		T-2		T-3		T-4	
	Leachate	Runoff	Leachate	Runoff	Leachate	Runoff	Leachate	Runoff	Leachate	Runoff
1st event										
BDE-17	N.D.	0.002	0.003	0.002	0.01	0.001	N.D.	0.002	0.005	0.001
BDE-28	0.02	0.01	0.02	0.004	0.03	0.004	0.01	0.004	0.02	0.01
BDE-47	0.29	0.13	0.23	0.13	0.98	0.10	0.14	0.11	0.22	0.18
BDE-66	N.D.	0.01	N.D.	0.01	0.02	0.005	N.D.	0.005	0.01	0.005
BDE-85	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01
BDE-99	0.18	0.18	0.18	0.23	0.49	0.18	0.14	0.17	0.20	0.20
BDE-100	0.05	0.04	0.04	0.01	0.14	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05
BDE-138	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BDE-153	0.06	0.06	0.07	0.07	0.06	0.06	0.05	0.06	0.07	0.07
BDE-154	0.06	0.05	0.06	N.D.	0.06	0.06	0.07	0.06	0.07	0.06
BDE-183	0.13	0.12	0.13	0.14	0.08	0.11	0.19	0.12	0.14	0.13
BDE-191	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BDE-196	0.05	0.11	0.13	N.D.	0.05	0.10	0.08	0.23	0.12	0.12
BDE-197	0.05	0.10	0.07	N.D.	0.04	0.07	0.07	0.18	0.08	0.08
BDE-206	N.D.	0.91	2.55	3.39	N.D.	1.59	N.D.	1.93	N.D.	7.05
BDE-207	N.D.	0.57	N.D.	1.68	N.D.	0.58	N.D.	0.65	N.D.	1.59
BDE-209	N.D.	0.09	3.39	7.32	N.D.	9.54	3.82	17.41	N.D.	2.85
Σ PBDEs	0.89	2.40	6.86	12.99	1.96	12.43	4.62	20.96	0.97	12.38
DBDPE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.22	N.D.	N.D.	N.D.	1.30
anti-DP	N.D.	N.D.	1.86	3.29	1.54	6.49	0.79	2.05	4.90	6.83
syn-DP	N.D.	N.D.	0.49	3.32	0.58	2.62	0.47	0.71	1.95	2.95
Σ DP	N.D.	N.D.	2.35	6.61	2.12	9.11	1.26	2.76	6.85	9.78

f_{syn}	-	-	0.21	0.50	0.27	0.29	0.37	0.26	0.28	0.30
Dec 602	0.002	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.002	0.002
2nd event										
BDE-28	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.23	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BDE-47	N.D.	N.D.	N.D.	2.25	N.D.	N.D.	0.05	N.D.	N.D.	N.D.
BDE-99	N.D.	N.D.	N.D.	0.32	N.D.	0.01	N.D.	0.02	N.D.	0.02
BDE-100	N.D.	N.D.	N.D.	0.11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BDE-153	N.D.	0.02	0.04	N.D.	0.05	0.03	0.08	0.04	0.03	0.04
BDE-154	N.D.	0.03	0.05	N.D.	0.10	0.03	0.08	0.04	0.04	0.03
BDE-183	N.D.	0.05	N.D.	N.D.	N.D.	0.08	N.D.	0.09	N.D.	0.10
BDE-196	N.D.	0.04	N.D.	N.D.	N.D.	0.07	N.D.	0.07	N.D.	0.11
BDE-197	N.D.	0.07	N.D.	N.D.	N.D.	0.08	N.D.	0.08	1.53	0.11
BDE-206	1.77	0.27	3.08	0.61	1.64	1.07	2.09	0.96	2.05	5.31
BDE-207	1.25	0.73	2.22	1.33	6.92	1.31	3.77	1.48	3.42	3.47
BDE-209	N.D.	N.D.	57.40	41.03	24.95	27.42	35.95	26.86	68.29	147.08
Σ PBDEs	3.01	1.21	62.78	45.65	33.87	30.10	42.01	29.63	75.35	156.27
DBDPE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.80
anti-DP	N.D.	N.D.	1.57	4.95	1.27	4.29	0.95	4.59	N.D.	5.78
syn-DP	N.D.	N.D.	0.66	0.19	0.38	0.59	0.59	2.56	N.D.	1.67
Σ DP	N.D.	N.D.	2.23	5.13	1.65	4.88	1.54	7.15	N.D.	7.45
f_{syn}	-	-	0.30	0.04	0.23	0.12	0.38	0.36	-	0.22
Dec 602	N.D.	0.001	N.D.	0.01	0.003	0.003	0.002	0.001	N.D.	0.001
3rd event										
BDE-17	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.004	N.D.	N.D.	N.D.	0.01

BDE-28	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BDE-66	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.03
BDE-85	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.04
BDE-99	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.05	N.D.	N.D.
BDE-100	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02
BDE-153	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	N.D.	N.D.
BDE-154	N.D.	0.04	N.D.	0.06	N.D.	0.04	N.D.	0.02	N.D.	0.03
BDE-183	N.D.	0.01	N.D.	0.04	N.D.	0.05	0.42	0.12	0.49	0.06
BDE-184	0.01	0.02	N.D.	0.02	0.02	0.02	N.D.	N.D.	N.D.	0.13
BDE-191	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.05
BDE-196	0.17	0.22	0.14	0.31	0.12	0.29	0.56	0.10	0.41	0.12
BDE-197	0.16	0.14	0.09	0.15	0.12	0.16	0.44	0.01	0.43	0.12
BDE-206	1.00	0.69	1.23	17.32	1.34	6.21	2.03	2.66	1.05	13.35
BDE-207	1.00	0.59	0.93	5.63	1.01	2.91	1.79	1.08	1.07	3.36
BDE-209	0.03	0.73	59.59	805.29	65.21	299.66	69.86	154.39	49.91	447.39
Σ PBDEs	2.36	2.43	61.97	828.80	67.82	309.36	75.11	158.46	53.36	464.70
DBDPE	N.D.	N.D.	N.D.	0.26	N.D.	0.32	0.24	1.63	2.10	4.80
anti-DP	N.D.	N.D.	0.95	11.06	N.D.	2.55	N.D.	3.27	0.43	15.86
syn-DP	N.D.	N.D.	N.D.	4.51	N.D.	1.84	N.D.	0.99	0.02	5.43
Σ DP	N.D.	N.D.	0.95	15.57	N.D.	4.39	N.D.	4.26	0.45	21.29
<i>f_{syn}</i>	-	-	-	0.29	-	0.42	-	0.23	0.04	0.26
Dec 602	N.D.	0.003	N.D.	0.01	N.D.	0.004	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: not detected.

BDE-77, -119, -156, Dec 603, Dec 604, CP and Mirex were not detected in any sample.

Table S6. Calculation of the amount (%) of PFOS, BDE-209 and DP removed from soil through leachate and runoff in the different rainfall events.

	PFOS					BDE-209					DP				
	[PFOS] (ng/L)	Water volume (L)	Amount eluted (ng)	Amount in soil (mg)	Amount removed from soil (%)	[BDE- 209] (ng/L)	Water volume (L)	Amount eluted (ng)	Amount in soil (mg)	Amount removed from soil (%)	[DP] (ng/L)	Water volume (L)	Amount eluted (ng)	Amount in soil (mg)	Amount removed from soil (%)
Leachate															
1st event															
T-1	23.9	167	3991.3	10.1	0.040	N.D.	167	N.D.	192.4	---	N.D.	167	N.D.	3.9	---
T-2	11.7	169	1977.3	10.4	0.019	N.D.	169	N.D.	69.5	---	0.4	169	67.6	3.0	0.002
T-3	6.1	162	988.2	8.7	0.011	0.4	162	64.8	49.4	0.0001	0.1	162	16.2	2.8	0.001
T-4	22.9	163	3732.7	22.9	0.016	N.D.	163	N.D.	197.7	---	0.8	163	130.4	5.8	0.002
2nd event															
T-1	23.4	169	3954.6	10.1	0.039	2.1	169	354.9	192.4	0.0002	0.1	169	16.9	3.9	0.0004
T-2	5.5	169	929.5	10.4	0.009	1.0	169	169.0	69.5	0.0002	0.1	169	16.9	3.0	0.001
T-3	3.1	169	523.9	8.7	0.006	1.6	169	270.4	49.4	0.001	0.1	169	16.9	2.8	0.001
T-4	14.7	169	2484.3	22.9	0.011	3.3	169	557.7	197.7	0.0003	N.D.	169	N.D.	5.8	---
3rd event															
T-1	6.8	413	2808.4	10.1	0.028	6.5	413	2684.5	192.4	0.001	0.1	413	41.3	3.9	0.001
T-2	5.7	448	2553.6	10.4	0.025	11.5	448	5152.0	69.5	0.007	N.D.	448	N.D.	3.0	---
T-3	4.0	429	1716.0	8.7	0.020	7.2	429	3088.8	49.4	0.006	N.D.	429	N.D.	2.8	---
T-4	11.8	409	4826.2	22.9	0.021	7.0	409	2863.0	197.7	0.001	0.1	409	40.9	5.8	0.001
Total															
T-1	54.1	749	10754.3	10.1	0.106	8.6	749	3039.4	192.4	0.002	0.2	749	58.2	3.9	0.001
T-2	22.9	786	5460.4	10.4	0.053	12.5	786	5321.0	69.5	0.008	0.5	786	84.5	3.0	0.003
T-3	13.2	760	3228.1	8.7	0.037	9.2	760	3424.0	49.4	0.007	0.2	760	33.1	2.8	0.001

T-4	49.4	741	11043.2	22.9	0.048	10.3	741	3420.7	197.7	0.002	0.9	741	171.3	5.8	0.003
Runoff															
1st event															
T-1	219.3	30	6579.0	10.1	0.065	10.7	30	321.0	192.4	0.0002	9.7	30	291.0	3.9	0.007
T-2	59.2	28	1657.6	10.4	0.016	15.1	28	422.8	69.5	0.001	14.4	28	403.2	3.0	0.013
T-3	115.3	41	4727.3	8.7	0.054	29.7	41	1217.7	49.4	0.002	4.7	41	192.7	2.8	0.007
T-4	415.1	35	14528.5	22.9	0.063	3.7	35	129.5	197.7	0.0001	12.6	35	441.0	5.8	0.008
2nd event															
T-1	72.8	7	509.6	10.1	0.005	10.0	7	70.0	192.4	0.00004	1.3	7	9.1	3.9	0.0002
T-2	92.0	16	1472.0	10.4	0.014	6.2	16	99.2	69.5	0.0001	1.1	16	17.6	3.0	0.001
T-3	79.0	35	2765.0	8.7	0.032	9.0	35	315.0	49.4	0.001	2.4	35	84.0	2.8	0.003
T-4	310.2	34	10546.8	22.9	0.046	31.4	34	1067.6	197.7	0.001	1.6	34	54.4	5.8	0.001
3rd event															
T-1	33.8	60	2028.0	10.1	0.020	179.2	60	10752.0	192.4	0.006	3.5	60	210.0	3.9	0.005
T-2	67.6	54	3650.4	10.4	0.035	71.1	54	3839.4	69.5	0.006	1.0	54	54.0	3.0	0.002
T-3	73.6	67	4931.2	8.7	0.057	235.3	67	15765.1	49.4	0.032	6.5	67	435.5	2.8	0.016
T-4	93.2	66	6151.2	22.9	0.027	328.6	66	21687.6	197.7	0.011	15.6	66	1029.6	5.8	0.018
Total															
T-1	325.9	97	9116.6	10.1	0.090	199.9	97	11143.0	192.4	0.006	14.5	97.0	510.1	3.9	0.013
T-2	218.8	98	6780.0	10.4	0.065	92.4	98	4361.4	69.5	0.006	16.5	98.0	474.8	3.0	0.016
T-3	267.9	143	12423.5	8.7	0.143	274.0	143	17297.8	49.4	0.035	13.6	143.0	712.2	2.8	0.025
T-4	818.5	135	31226.5	22.9	0.136	363.7	135	22884.7	197.7	0.012	29.8	135.0	1525.0	5.8	0.026

N.D.: not detected.

Water volume (L): absolute volume of leachate or runoff water collected. Amount in soil: amount of pollutants (mg) in soil at the beginning of the experiment.

Concentrations of BDE-209 and DP in leachate and runoff (ng/g d.w.) have been normalized to ng/L.

Table S7. Main physicochemical properties of PFOS, BDE-209 and DP for the calculation of leaching potential (L_p) and the Groundwater Ubiquity Score (GUS)

Compound	Molecular weight (g/mol)	Water solubility (S) (mg/L)	Vapour pressure (V_p) (Pa)	Organic carbon-water partition coefficient (K_{oc}) (cm^3/g)	$T_{1/2}$ (soil) (d)	Leaching potential (L_p) ^a	GUS index ^b
PFOS	500.13	0.1039	0.853	2.56×10^3	2430	4.75×10^{-5}	2 (Transitional)
BDE-209	959.17	2.84×10^{-11}	6.23×10^{-10}	4.78×10^7	3650	9.54×10^{-10}	-13.11 (Non-leacher)
DP	653.73	1.68×10^{-8}	9.41×10^{-8}	6.04×10^9	30000	2.97×10^{-11}	-25.88 (Non-leacher)

S , V_p , K_{oc} and $T_{1/2}$ values were calculated using EPISuite 4.1 software.

^a Laskowski et al, 1982; Wilson et al, 1996. $L_p = S / (V_p \times K_{oc})$. Compounds with higher leachability in the environment are indicated by the higher L_p values.

^b Gustafson, 1989. $GUS = \log_{10}(T_{1/2} \text{ soil}) \times (4 - \log_{10} K_{oc})$. GUS value >2.8 (Leacher); GUS value $=1.8-2.8$ (Transition zone); GUS value <1.8 (Non-leacher).

Table S8. Calculation (mean \pm SD) of the field-based K_d and K_{oc} distribution coefficients of PFOS, BDE-209 and DP between water and soil samples analyzed.

	Log K_d			Log K_{oc}		
	Leachate	Runoff	Water	Leachate	Runoff	Water
PFOS	3.71 \pm 0.24	2.64 \pm 0.11	3.17 \pm 0.60	5.12 \pm 0.28	4.05 \pm 0.14	4.59 \pm 0.61
BDE-209	5.00 \pm 0.28	3.82 \pm 0.31	4.41 \pm 0.69	6.41 \pm 0.24	5.23 \pm 0.28	5.82 \pm 0.68
DP	4.96 \pm 0.25	3.43 \pm 0.07	4.19 \pm 0.84	6.37 \pm 0.25	4.85 \pm 0.07	5.61 \pm 0.83

Leachate: concentration (ng/kg) in soils in relation to concentration in leachate (ng/L).

Runoff: concentration (ng/kg) in soils in relation to concentration in runoff (ng/L).

Water: concentration (ng/kg) in soils in relation to concentration (ng/L) in water (sum of leachate and runoff).

F_{oc} : 4.30% (T-1), 3.66% (T-2), 3.42% (T-3) and 4.13% (T-4).

ANEXO IV

Artículo III

“Bioaccumulation of emerging organic compounds (perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants) by earthworms in biosolid amended soils”.

Irene Navarro, Adrián de la Torre, Paloma Sanz, Javier Pro, Gregoria Carbonell, María de los Ángeles Martínez.

Environmental Research (2016) 149: 32-39.



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envres

Bioaccumulation of emerging organic compounds (perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants) by earthworm in biosolid amended soils

Irene Navarro^{a,*}, Adrián de la Torre^a, Paloma Sanz^a, Javier Pro^b, Gregoria Carbonell^b, María de los Ángeles Martínez^a

^a Persistent Organic Pollutants Group, Department of Environment, CIEMAT, Avda. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain

^b Laboratory for Ecotoxicology, Department of the Environment, INIA, Crta. La Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2015

Received in revised form

26 April 2016

Accepted 2 May 2016

Keywords:

Perfluoroalkyl substances
Polybrominated diphenyl ethers
Biosolid
Bioaccumulation factor
Earthworm

ABSTRACT

In the present work, the bioaccumulation behavior of 49 target emerging organic compounds (20 perfluoroalkyl substances, PFASs, and 29 halogenated flame retardants, HFRs) was studied in soil invertebrates (*Eisenia andrei*). Multi species soil systems (MS · 3) were used to assess the fate and the effects associated with the application of four biosolids in agricultural soil on terrestrial soil organisms. Biosolid amendment increased concentrations 1.5–14-fold for PFASs, 1.1–2.4-fold for polybrominated diphenyl ethers, PBDEs, and 1.1–3.6-fold for chlorinated flame retardants, CFRs. Perfluorooctanesulfonate, PFOS, (25%) and BDE-209 (60%) were the predominant PFAS and HFR compounds, respectively, in biosolids-amended soils. Total concentrations (ng/g dry weight) in earthworms from biosolid-amended soils ranged from 9.9 to 101 for PFASs, from 45 to 76 for PBDEs and 0.3–32 for CFRs. Bioaccumulation factors (BAFs) were calculated to evaluate the degree of exposure of pollutants in earthworms. The mean BAF ranged from 2.2 to 198 for PFASs, 0.6–17 for PBDEs and 0.5–20 for CFRs. The relationship of PFAS and PBDE BAFs in earthworms and their log K_{ow} were compared: PFAS BAFs increased while PBDE BAFs declined with increasing log K_{ow} values. The effect of the aging (21 days) on the bioavailability of the pollutants in amended soils was also assessed: the residence time affected differently to the compounds studied.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Perfluoroalkyl substances (PFASs) and halogenated flame retardants (HFRs) as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and dechlorane plus (DP) have been detected in a variety of wildlife and environment (Giesy and Kannan, 2001; Hansen et al., 2001; De Wit, 2002; De Boer et al., 2003; Shoeib et al., 2004; Higgins et al., 2005; De la Torre et al., 2012a). These compounds have been intentionally incorporated in common consumer and industrial products and their production, use and disposal has led to their widespread distribution in the environment. One potential mechanism for introduction of these compounds to the environment is the application of biosolids to land. The recycling of biosolids to agriculture is the option favored internationally for biosolid management as it contributes to improve soil properties (EEC, 1986, 1991). However, the amendment in agricultural soils has

been demonstrated to cause the contamination of the soil (Sellström et al., 2005; Washington et al., 2010). The migration of pollutants from soil to plants or soil organisms could facilitate a probable entry pathway into the food chain. Organisms can achieve high concentrations of certain organic contaminants relative to concentrations of these substances in the environment they inhabit. Food web analyses have shown that PFASs and HFRs can bioaccumulate and biomagnify in aquatic ecosystems (Law et al., 2003; Houde et al., 2006). In terrestrial ecosystems, earthworms are an important link in transporting environmental contaminants from soil to other organisms in terrestrial food webs (Sellström et al., 2005), being an appropriate model organism to assess bioavailability as it lives in close contact with soil, has thin and permeable cuticle, and also consumes large amounts of soil (Jager et al., 2005). Besides, these invertebrates can change the availability of inorganic and organic pollutants in soils. Zhao et al. (2014) detected that the co-presence of wheat and earthworms enhanced the bioavailability of PFASs in soil. Therefore, it is necessary studies focused on pollutants from soil to better

* Corresponding author.

E-mail address: i.navarro@ciemat.es (I. Navarro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.004>

0013-9351/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

understand their bioaccumulation potential in terrestrial environment. The accumulation of chemicals is a dynamic process consisting of uptake, partition, storage, and excretion, which is greatly influenced by biological (target organisms or organs) and geochemical (physicochemical properties of the pollutants and the medium) factors (Wen et al., 2011). Then, due to their different physicochemical properties of PFASs and HFRs, the comparison of the bioaccumulation behavior would be of great interest.

In the present study, multi species soil systems (MS-3) are used to assess the fate and the effects associated with the application of biosolids in agricultural soil on terrestrial soil organisms. MS-3 is a terrestrial microcosm, an artificial assemblage of soil macro-organisms (microorganisms, invertebrates and plants) lying on homogeneous columns of sieved natural soil that allows to simulate agricultural land conditions (Fernández et al., 2004; Carbonell et al., 2009). In this system, a light/dark period and daily irrigation produces a gradient of conditions from the top to the bottom of the column. For this reason, the soil-air interface, water transport and degradation/sorption kinetics are reproduced in a better way than in standard soil bioassays.

The main objective of this work was to determine the transfer and bioaccumulation of selected emerging organic compounds as PFASs, PBDEs, decabromodiphenylethane, DBDPE, Dechloranes (602, 603, 604, and DP), Chlordane Plus (CP) and Mirex from biosolid-amended soil to earthworm (*Eisenia andrei*) using MS-3 systems. To the best of our knowledge, this is the first time to compare the bioaccumulation behavior of PFASs and HFRs in earthworms (*Eisenia andrei*) exposed to biosolids-amended soils.

2. Materials and methods

2.1. Standards and reagents

Analysis of PFASs (perfluorobutanesulfonate -PFBS-, perfluorohexanesulfonate -PFHxS-, perfluorooctanesulfonate -PFOS-, perfluorodecane sulfonate -PFDS-, perfluorobutanoic acid -PFBA-, perfluoropentanoic acid -PFPeA-, perfluorohexanoic acid -PFHxA-, perfluoroheptanoic acid -PFHpA-, perfluorooctanoic acid -PFOA-, perfluorononanoic acid -PFNA-, perfluorodecanoic acid -PFDA-, perfluoroundecanoic acid -PFUdA-, perfluorododecanoic acid -PFDoA-, perfluorotridecanoic acid -PFTriDA-, perfluorotetradecanoic acid -PFTeDA-, perfluorohexadecanoic acid -PFHxDA-, perfluorooctadecanoic acid -PFODA-, perfluorooctanesulfonamide -FOSA-, N-methyl perfluorooctanesulfonamide -N-MeFOSA- and N-ethyl perfluorooctanesulfonamide -N-EtFOSA-), PBDEs (IUPAC congener numbers: BDE-17, -28, -47, -66, -77, -85, -99, -100, -119, -138, -153, -154, -156, -183, -184, -191, -196, -197, -206, -207, -209), DBDPE and DP were performed by isotopic dilution using labelled ^{13}C , ^{18}O or deuterated standard solutions: MPFAC-MXA, N-d3-MeFOSA, N-d5-EtFOSA, $^{13}\text{C}_9$ -PFNA, MBDE-MXE and BDE-CVS-EISS were purchased from Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canada) and MDP from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA). Dec 602 (CAS# 31107-44-5), Dec 603 (CAS# 13560-91-4) and Dec 604 (CAS# 34571-16-9) were obtained from Toronto Research Chemical Inc. (Toronto, ON, Canada).

EnviCarb cartridges (500 mg, 6 mL) were provided from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Oasis WAX cartridges (500 mg, 6 mL) from Waters (Milford, MA, USA), both used for solid phase extraction (SPE).

Other chemicals used as anhydrous sodium sulphate, copper fine powder, sulphuric acid (95–97%) and solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and toluene) for organic trace analysis were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium acetate, ammonium hydroxide, sodium acetate, siliceous

earth extrapure, acetic acid, methanol, acetonitrile were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

2.2. Study design

Multi species soil systems (MS-3) were used as rapid tests for assessing in biosolid-amended soil and exposed earthworms the presence of 49 emerging organic compounds: 20 PFASs (4 sulphonates -PFASs-, 13 carboxylic acids -PFCAs- and 3 sulphonamides), PBDEs (21 congeners from tri to decaBDE), DBDPE, DP, Dec 602, Dec 603, Dec 604, CP and Mirex.

Firstly, a pollutant characterization was conducted in 16 biosolids: 4 municipal solid waste (MSW) compost and 12 wastewater treatment plant (WWTP) biosolids. Samples were collected during 2011 and were kindly provided by Spanish waste management companies and wastewater treatment plants. Then, only four biosolids, with a higher burden of facing contaminants, were selected for MS-3 experiment: an aerobically digested municipal solid waste (MSW) compost (W-1), an anaerobically digested thermal drying sludge (W-2), an aerobically digested composted sewage sludge (W-3) and an anaerobically digested MSW compost (W-4).

MS-3 systems consisted in PVC cylinders (20 cm internal diameter and 30 cm high) covered by a fine nylon mesh at the bottom to avoid soil loss and connected to a leachate collection device. A mixture (8 kg) of each biosolid selected and a control soil was used to fill the microcosm columns. Then, the columns were saturated with spring water and 30 plant seeds (*Triticum aestivum*, *Brassica rapa* and *Vicia sativa*), and 20 earthworms (*Eisenia andrei*) were introduced. During the exposure period (21 days) the MS-3 columns were daily irrigated (100 mL/day) to simulate 1000 mm rainfall/year. The experiments were conducted in a climate room with a light – dark cycle of 16–8 h, air condition of $21 \pm 1^\circ\text{C}$, and humidity of 55–60%.

The soil used in this study was a typical agricultural soil with known history; pesticides and fertilizers had not been applied at least for the last 10 years. The soil sample was taken within the top 20 cm soil layer, sieved (2 mm mesh), and homogenized before use. Biosolid application rates (0.12–0.56 kg biosolid/treatment) were calculated by considering the nitrogen agronomic requirement of plants sowed. The four treatments and the control were performed in triplicate, although due to small sample size (especially for earthworms) chemical analyses were conducted with pooled samples.

After MS-3 experiment, earthworms were allowed to depurate for 24 h to avoid the presence of soil particulates that could interfere with the bioaccumulation study.

2.3. Sample preparation

PFASs from biosolids and soils were extracted and purified according to the analytical procedure previously described (Navarro et al., 2011). Earthworms spiked with MPFAC-MXA, N-d3-MeFOSA and N-d5-EtFOSA solutions were extracted with acetonitrile, vortex-mixed, shaken for 10 min, ultrasonicated at 40°C for 30 min and centrifuged for 15 min at 3000 rpm. The extraction process was repeated twice with fresh acetonitrile. Extracts were then combined and evaporated to 2 mL under nitrogen. Then, 100 μL of acetic acid was added before centrifugation for 5 min at 2000 rpm and passed through EnviCarb SPE cartridges. The purified extract was reduced to 140 μL under a gentle stream of nitrogen using TurboVap II evaporator (Vertex, Technics, Madrid, Spain). 240 μL of methanol and 240 μL of 2 mM ammonium acetate in Milli-Q water were added to the final extract spiked with $^{13}\text{C}_9$ -PFNA solution prior to HPLC-MS/MS injection.

For HFR determination, samples were processed according to

methods reported previously (De la Torre et al., 2011a, 2011b, 2012b). Briefly, waste and soil samples spiked with MBDE-MXE and MDP were extracted with a mixture of hexane: dichloromethane (1:1 v/v) by pressurized fluid extraction (ASE 200, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Earthworm samples were Soxhlet extracted with hexane/dichloromethane (1:1, v/v) for 24 h. The extracts were solvent exchanged with hexane and digested with 50 mL of concentrated sulphuric acid. Clean up and fractionation steps were accomplished using an automated purification Power Prep™ System (FMS Inc., USA) including acidic silica gel, basic alumina and carbon columns. Fractions were concentrated to dryness under a flow of nitrogen and redissolved in nonane and then spiked with the ^{13}C injection standards solutions (BDE-CVS-EISS) prior to HRGC-LRMS or HRMS analyses.

2.4. Instrumental analysis

PFASs were determined by HPLC-MS/MS (Varian 212 Liquid Chromatograph coupled to a Varian 320 triple quadrupole MS). The chromatographic separation was carried out in an ACE C18-PPF (50 × 2.1 mm, 3 μm) analytical column. PBDEs were analyzed by LRMS (Agilent 6890 Gas Chromatograph connected to an Agilent 5973 MSD) for biosolids and soils. Earthworms determination required the sensitivity of the HRMS (Micromass Autospec Ultima). In both cases chromatographic separation was performed with a short and narrow capillary column (15 m × 0.25 mm i. d. × 0.10 μm film thickness; DB5 MS from J&W Scientific, Folsom CA). Dechlorane compounds were analyzed by ECNI-MS (Agilent 5973MSD) using methane as a reagent gas. Complete details of instrumental method are described elsewhere (De la Torre et al., 2011a, 2011b; Navarro et al., 2011).

2.5. Quality assurance

Some criteria were used to ensure the correct identification and quantification of all analytes: i) ± 3 s retention time between the analyte and the standard, ii) the ratio of quantifier and qualifier ions had to be within $\pm 15\%$ of the theoretical values and iii) signal to noise ratio had to be greater than 3:1. Procedural blanks were conducted with each batch and were extracted, purified and analyzed under the same conditions. In addition, instrumental blanks consisting of methanol (HPLC) and nonane (HRGC) were run before each sample injection to check for memory effects and contamination from analysis systems. Mean recoveries were 63%, 90% and 66% for PFASs, PBDEs and DP, respectively. Limits of detection (LODs), defined as the concentration giving a signal to noise ratio greater than 3 were in the range of 0.01–0.65 ng/g for PFASs, 0.002–8.20 pg/g for PBDEs and 1.00–9.50 pg/g for dechlorane compounds.

3. Results and discussion

3.1. Biosolid characterization

Biosolids from different Spanish WWTPs (n=16) were analyzed to characterize their PFAS and HFR content. Levels found of 9 PFASs and 22 HFRs are illustrated in Table S1. BDE-47, -99, -100, -153, -154, -183, -196, -197, -206, -207, -209, anti-DP, syn-DP and Dec-603 were detected in all samples, followed by BDE-28 and Dec-602 (94%), PFDA (88%), PFOA (75%), BDE-184 (69%) and PFOS (63%). PFOS (3.95–83.5 ng/g d.w.), PFHxA (4.65–32.2 ng/g d.w.), PFOA (0.99–14.0 ng/g d.w.), PFDA (0.54–18.3 ng/g d.w.), BDE-99 (1.45–17.1 ng/g d.w.), BDE-206 (2.02–38.1 ng/g d.w.), BDE-207 (2.94–41.1 ng/g d.w.), BDE-209 (16.1–1312 ng/g d.w.) and DP (sum of anti- and syn-DP; 2.28 – 51.8 ng/g d.w.) were the

compounds with higher contribution to the total pollutant contents. To the best of our knowledge this is the first time PFASs, brominated flame retardants, BFRs, and Dechloranes are measured at the same time in biosolids, however levels of these pollutants are in agreement with previously PFASs (Navarro et al., 2011), BFRs (De la Torre et al., 2011b, 2012b) and DP (De la Torre et al., 2011a) reported concentrations.

From the 16 biosolids analyzed, only four were selected for MS-3 experiment (see Table S2). Most of compounds studied, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFDoA, BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -206, -207, -209 and DP, showed statistically significant differences ($p < 0.05$; Student's *t*-test) between selected biosolids, which might be of interest so as to check the compound behavior in the MS-3 experiment. Several PFASs were found in the four biosolids selected. Only PFHxS and PFDS were not detected in any sample. PFAS concentrations ranged from 0.21 to 64.4 ng/g d.w., being these ones higher in sewage sludge biosolids (W-2 and W-3) than those obtained in MSW compost (W-1 and W-4). W-2 was the biosolid with the highest PFAS content (120 ng/g d.w.) followed by W-3 (96.8 ng/g d.w.), W-1 (27.3 ng/g d.w.) and W-4 (17.6 ng/g d.w.). PFOS (37%), PFBA (31%), PFOA (11%) and PFDA (10%) were the compounds with higher contribution to the PFAS total content in these four biosolids. Considering halogenated flame retardants (HFRs), only BDE-77, -119, -156, Dec-604 and Mirex were under LOD in the biosolids selected. PBDE concentrations ranged from 0.03 to 347 ng/g d. w, DBDPE from 95.3 to 149 ng/g d.w. and CFRs from 0.003 to 10.7 ng/g d.w. The four biosolids presented a similar HFR pattern: PBDEs > DBDPE > DP > Dec 603 > Dec 602 and CP, which is in agreement to previous results reported in Spanish biosolids (De la Torre 2011a, 2011b, 2012b). BDE 209 was the predominant PBDE congener (78%) followed by BDE-207 (6%), -206 (5%), -99 (4%) and -47 (2%). Interestingly, relative high contribution of non-aBDEs were found, which evidences a decaBDE commercial mixture origin (La Guardia et al., 2006). The fraction of anti-DP (f_{anti}) was defined as the concentration of anti-DP divided by the total DP. f_{anti} value in biosolids (0.74 ± 0.02 ; mean \pm SD) closely resembles the OxyChem DP mixture ($f_{anti} = 0.75$) (Sverko et al., 2011).

3.2. Biosolid application to soil

Although pesticides or fertilizers had not been applied to the soil used in the experiments for the last 10 years, the presence of other pollutants as PFASs or HFRs were detected in the reference soil. The use of agronomic rates for biosolid application limited the amount of chemical added to the soil, but these rates were required to reproduce agricultural land conditions. However, a slight increase in the concentration of the pollutants due to the amendment was observed, which allowed to evaluate the effect on soil invertebrates.

Total concentrations for PFASs ranged from 0.60 to 0.97 ng/g d. w. in reference or control soils and 1.01–3.72 ng/g d.w. in amended soils (Table S3). Concentrations of these compounds in soils correlated linearly ($r = 0.597$; $p < 0.01$; Spearman test) with concentrations in biosolids. PFOS (25%) was the predominant compound followed by PFBA and PFOA (22%). Biosolid-amended soil/control soil ratios were calculated to assess the contribution of the biosolid application in soil (Fig. S1). Mean values for total PFASs (6.56 ± 1.73 ; mean \pm SD) and PFCAAs (1.94 ± 0.60) were higher than 1, showing an increase in the concentration of PFASs in soil due to the amendment. PFNA present the highest value, 14.04, followed by PFOS (2.88) > PFOA (2.34) > PFDoA (2.27) > PFHxA (2.17). Considering the different amendment treatments, the treatment 2 (T-2) presents higher ratio values (5.20 ± 7.56). The biosolid used in this treatment, an anaerobically digested thermal drying sludge

(W-2), achieved the highest total PFAS concentration (120 ng/g d. w.), followed by W-3 (96.8 ng/g d.w.), W-1 (27.3 ng/g d.w.) and W-4 (17.5 ng/g d.w.). This tendency found in the biosolids corresponds well with the soil ratios calculated: T-2 > T-3 (3.79 ± 6.55) > T-1 (1.99 ± 0.84) > T-4 (1.61 ± 2.04), revealing a dose dependent behavior.

Total concentrations for PBDEs ranged from 7.19 to 11.5 ng/g d. w. in reference or control soils and 7.5–35.2 ng/g d.w. in amended soils, 0.95–1.60 and 0.44–16.4 ng/g d.w. respectively, for DBDPE and 0.27–0.67 and 0.22–1.39 ng/g d.w. respectively for DP and related compounds (Table S3). Concentrations in soils correlated linearly ($r > 0.831$; $p < 0.01$) with concentrations in biosolids. Slightly higher f_{anti} value (0.80; mean) was obtained in amended soils compared to that found in the biosolids (0.74), which has been interpreted as indicative of the preferential environmental degradation of the *syn* isomer (Wang et al., 2010; Sverko et al., 2011). BDE-209 was the predominant PBDE congener (75%) followed by –207 (6%), –206 (4%), –99, –196 and –197 (3%). The contribution of PBDEs in the amended soils corresponds well with the tendency found in the biosolids. Biosolid-amended soil/control soil ratios for PBDEs, DP and related compounds were also calculated (Fig. S1). Mean values for total PBDEs (1.59 ± 0.71 ; mean \pm SD), DBDPE (3.01 ± 3.63) and DP (1.72 ± 0.56) were lower than calculated for PFASs, but higher than 1, showing as well, an increase in soil due to the amendment. The highest ratio was for *syn*-DP (3.64) followed by DBDPE > Dec-602 (2.73) > BDE-99 (2.43) > BDE-100 (2.33). The treatment 4 (T-4), which corresponds an anaerobically digested MSW compost, present higher ratio values (2.67 ± 1.78), followed by T-2 (1.67 ± 1.11) > T-3 (1.60 ± 0.79) > T-1 (1.47 ± 1.06). In this case, a significant dose dependent tendency is observed by DBDPE, showing ratio values: T-4 (8.36) > T-2 (2.14) > T-3 (1.06) > T-1 (0.48) that are in consistency with the corresponding concentrations for biosolids: W-4 (149.46 ng/g d.w.) > W-2 (125.83 ng/g d.w.) > W-3 (95.27 ng/g d. w.) > W-1 (< LOD). This dose dependent behavior has not been detected for all compounds, which could be easily attributed to the heterogeneity inherent of biosolids.

3.3. Bioaccumulation in earthworms

3.3.1. Concentrations of PFASs and HFRs in earthworms

PFOS and long-chain perfluorinated carboxylic acids, PFCAs, (C_8 – C_{14} : PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA, PFDoA, PFTrDA, PFTeDA) were detected in earthworms. Total PFAS concentrations in earthworms from biosolid-amended soils ranged from 9.88 to 99.86 ng/g d.w. and were higher than concentrations from control ones (1.76 ng/g d.w.) (Table S3, Fig. 1). Concentrations of PFOA, PFUdA, PFTrDA and PFTeDA in earthworms correlated well with levels described in biosolids ($r > 0.877$; $p < 0.01$). The highest value of total PFAS concentration (99.86 ng/g d. w) corresponds to earthworms from T-2, which showed also the highest PFAS values in biosolids (120.02 ± 15.86 ng/g d.w.) and soils (2.52 ± 1.56 ng/g d.w.). Percentage distributions of PFASs observed in earthworms in the different treatments are shown in Fig. 2. PFOS (39%) was the predominant compound followed by PFDoA and PFTeDA (22%) and PFTrDA (15%). The latter three and PFUdA, were found in biosolids, but PFTrDA and PFTeDA were not detected in soils. Therefore, their presence in earthworms may indicate accumulation phenomena although soil levels were below detection limits. PFBS was not detected in earthworms, although concentration in soil in some case (0.19 ng/g d.w.) reached levels similar to PFOS (0.21 ng/g d. w.). This fact suggests low bioaccumulation rates for PFBS in earthworms, which is in agreement with previous studies conducted in biota (Martin et al., 2003; Loi et al., 2011).

Halogenated flame retardants (16 PBDE congeners and 5 CFRs) were also detected in earthworms. As mentioned for PFASs,

pollutant levels above detection limits in the control soil resulted in measurable levels in earthworms obtained in the MS-3. However, a statistically significant PBDE concentration increase was observed in earthworms when we considered biosolid amended soils (from 7.5 up to 76.3 ng/g d.w. for PBDEs and from 0.23 up to 31.4 ng/g d.w. for DP, respectively; Table S3 and Fig. 1). PBDE concentrations in earthworms correlated well with levels found in biosolids ($r = 0.715$; $p < 0.01$) and soils ($r = 0.703$; $p < 0.01$). Furthermore, PBDE pattern in earthworms also resembles the one described in amended soils, being BDE-209 the predominant congener (81%) followed by –47 and –99 (6%), see Fig. 2. CFR concentrations in earthworms correlated linearly with concentrations in biosolids ($r = 0.845$; $p < 0.01$). Concentrations of *anti*-DP in most of the earthworm samples, as in all biosolids selected and soil ones were notably higher than those of *syn*-DP. This predominance of *anti*-DP isomer is in accordance with previous studies in biota (Kang et al., 2010; De la Torre et al., 2012a; Xiao et al., 2013; He et al., 2014). Mean f_{anti} in earthworms (0.66) was lower than corresponding value quantified in the amended soils (0.80). Data suggest an enrichment of *syn*-DP in earthworms relative to cultivation media, and although it must be viewed with caution regarding sampling size, similar behavior has been reported in aquatic species (Hoh et al., 2006; Tomy et al., 2007; Kang et al., 2010; He et al., 2014) which may support this hypothesis. The chemical structure of the *anti*-DP isomer should be more susceptible to biological attack than the less sterically hindered *syn*-DP isomer, which could explain a lower f_{anti} value in biological samples compared to the value of technical DP (Xiao et al., 2013).

3.3.2. Bioaccumulation factors of PFASs and HFRs in earthworms

Bioaccumulation factors (BAFs) are widely used to estimate the degree of exposure and the potential risk in wildlife based on levels of soil contamination. BAFs were determined by division of the amount found in earthworms on a dry weight basis (ng/g d.w.) by concentrations determined in soil on a dry weight basis (ng/g d. w.; mean soil $t=0$ and final) (Table S3). The mean organic content of the biosolid amended soils was $4.4 \pm 0.4\%$ (mean \pm SD) and the mean lipid content of earthworms was $9.3 \pm 0.3\%$. Due to the very low variability found between treatments, BAF values calculated have been considered comparable. PFAS BAF values in earthworms correlated linearly with total PFAS concentrations in biosolids ($r = 0.752$; $p < 0.01$). The mean BAF of PFASs ranged from 2.2 (PFOA) to 198 (PFDoA). Zhao et al. (2013) also reported the highest BAF value for PFDoA in earthworms exposed to artificially contaminated soils with PFASs. If BAFs for PFOS (21) and PFOA (2.2) are compared, PFASs with the same carbon chain length, values are higher for PFOS. This higher predominance of PFSA BAFs in comparison with PFCA BAFs is in accordance with other studies (Zhao et al., 2013; Wen et al., 2015). A calculation for the PFAS BAF on wet weight basis, for comparison with the literature data, shows that values ranged from 1.1 to 4.1 for PFOS, 0.2–0.4 (PFOA), 0.6–3.4 (PFDA), 1.6 (PFNA), 18 (PFUdA) and 11–115 (PFDoA) and most of them correspond well with data previously reported in worms (1.7–24 for PFOS, 3.2–8.3 for PFDA and 2.3–6.4 for PFUdA; Loi et al., 2011). BAFs were also calculated based on the concentration of the compounds in soils at the beginning and the end of the experiment (21 days), and some PFAS BAFs declined with the increasing residence time in soil (Fig. 3). The BAFs of PFOA, PFNA, PFDA and PFUdA decreased 26, 34, 58% and 32% respectively, suggesting that the bioavailability of these congeners in soil decreased as the time of their residence in soil increased. The contribution of these compounds to the total concentration of PFASs in soils was from 2 to 22% and 5–13% in earthworms. Nevertheless, the effect of the aging (21 days) on the bioavailability of PFOS, the main PFASs in soils (25%) and earthworms (39%), was not observed. According to Sijm et al. (2000), the

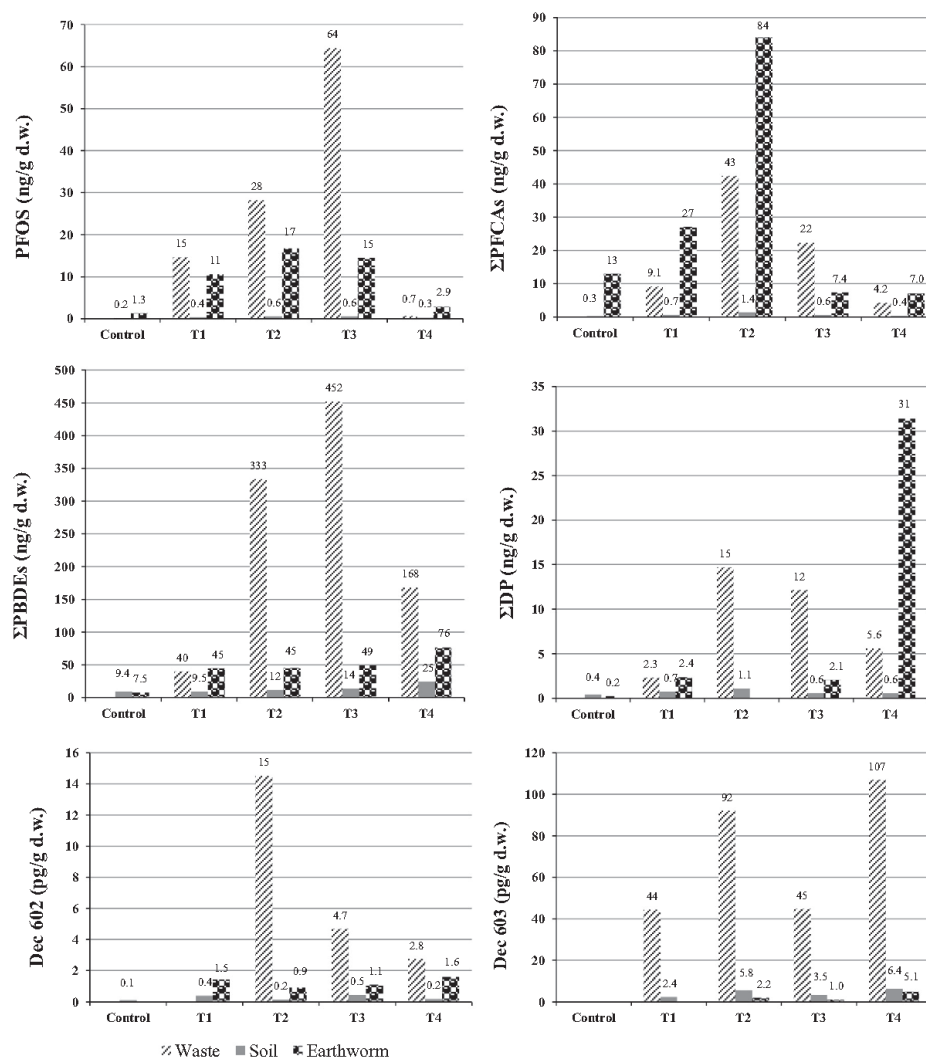


Fig. 1. Concentrations of PFOS, PFCAs (sum of C₆–C₁₄), PBDEs, DP (sum of *anti*- and *syn*-DP), Dec 602, and Dec 603 for the wastes, amended soils, and earthworms studied.

bioavailability of contaminants in soil depends on the physico-chemical properties of the chemicals, the characteristics of soil, the physiology and habitat of organisms and the residence time of the pollutants in soil matrix. By contacting with soil substrates for a long time, hydrophobic organic chemicals diffuse slowly into the micropores or components of solid organic matter in soils and the desorption-resistant fraction increases with time as the chemical remains in the soil (Hatzinger and Alexander, 1995). Once chemicals were entrapped into micropores in the soil, it would become very difficult for them to release into porewater, to be bioavailable and to be taken up by organisms. To explore this hypothesis, the relationship between PFAS BAFs in earthworms and the chemical log K_{ow} was investigated. As shown in Fig. 3, BAFs increased with the log K_{ow} and also with the perfluorinated chain length for PFCAs indicating an effective bioaccumulation of long-chain perfluorinated carboxylic acids in earthworms. This tendency has

been observed previously (Lasier et al., 2011; Zhao et al., 2013, 2014). Significant linear correlation was observed between Log BAF and Log K_{ow} for PFASs ($r = 0.527$, $p < 0.01$).

Bioaccumulation factors were also determined for HFRs (Table S3). PBDE bioaccumulation decreases with the bromination degree, which is in agreement to other studies (Sellström et al., 2005; Liang et al., 2010), and higher BAF was obtained for *syn*-DP (20) compared to *anti* isomer (16). Related to BAF values calculated on soil basis at the beginning and the end of the experiment, after aging for 21 days, the BAFs of some PBDE congeners decreased compared to corresponding BAFs from the initial biosolids-amended soil (see Fig. 3), suggesting that the bioavailability of these congeners in soil may decrease with the increasing residence time in soil: decrease in BAFs of BDE-47 (57%) > BDE-196 (37%) > BDE-206 (36%) > BDE-191 (35%). These congeners contributed to the total concentration of PBDEs in soils from 0.2 to 4%

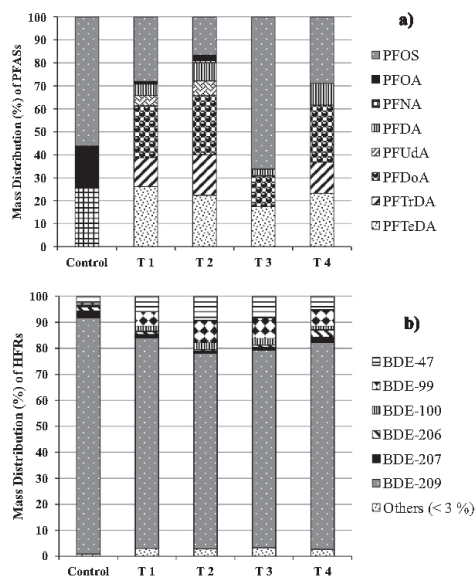


Fig. 2. Mass distribution (percentage of the total amount taken up by the earthworms) of PFASs (a) and PBDEs (b) in different treatments. For clarity, only compounds with contribution higher than 3% are shown; those with < 3% are included as others (BDE-17, BDE-28, BDE-138, BDE-153, BDE-154, BDE-183, BDE-184, BDE-191, BDE-196 and BDE-197).

and 0.1–7% in earthworms. The effect of the aging (21 days) on the bioavailability of the rest of the PBDE and CFRs were not significant. Thus, no differences were found for BDE-209, the major PBDE congener in soil (75%) and earthworm (76%). Liang et al. (2010) observed for earthworms exposed to PBDE artificially contaminated soils that, after 90 days aging, the bioavailability of the PBDE congeners was affected differently.

The relationship of PBDE and CFR BAFs in earthworms and their log K_{ow} is illustrated in Fig. 3. PBDE BAFs declined with increasing log K_{ow} of the congeners, significant linear correlation was found for PBDEs ($r = -0.491$, $p < 0.01$; Spearman test) and CFRs ($r = 0.773$, $p < 0.01$). PBDEs in soil become less available with their increasing log K_{ow} . These results are similar to findings previously reported (Sellström et al., 2005; Liang et al., 2010). The large molecular size (> 0.95 nm) and high hydrophobicity could limit the ability of PBDEs to penetrate in cell membranes and decrease the bioavailability and consequently, the uptake efficiency of the earthworms from the soil.

The HFR BAFs were found to be lower than PFAS ones, indicating a lower bioaccumulation potential in earthworms for the former compared to the latter. It was reported that concentration of PFASs in organisms positively correlated with protein content, rather than lipid content (Hoff et al., 2003). The PFASs possess a high affinity to proteins and, sometimes, they are referred as proteinophilic. Besides, they are potentially accumulative in biota, especially in protein-rich tissues (Bischel et al., 2010; Zhao et al., 2013; Loi et al., 2011). Nevertheless, PBDEs are lipophilic and bioaccumulate in the fatty tissues of the organisms (Voorspoels et al., 2006). Thus, significant correlations have been found in biota between concentrations of PBDEs and lipid content (Law et al., 2006; Yu et al., 2009; Xiang et al., 2007), and also between DP levels and lipid content (Tomy et al., 2007). The earthworms have high protein content, in the range of 65–67% dry weight, and lower lipid content, 10.9–12.1% (Zhao et al., 2013). The protein/lipid

content in earthworms and the different binding or accumulation affinities of PFASs (proteins) and HFRs (lipids) could explain the differences observed in BAFs and consequently, the different bioaccumulation behavior in earthworms.

3.3.3. Specific congener behavior of PBDEs in earthworms

Uptake efficiencies, metabolism, and bioavailability of the PBDE compounds to living organisms can account for the differences in congener profiles (Luross et al., 2002). It has been reported that the concentration ratio of BDE-99 and BDE-100 could be related to the difference in metabolism of biota in aquatic environment (Voorspoels et al., 2003; Xiang et al., 2007; Yu et al., 2009). Lower concentration ratios of BDE-99 to BDE-100 in biota (from 70:30 to 25:75) compared to those found in sediments (80:20) where they lived in, have been reported to reflect that the specie is capable of metabolizing BDE-99 (Voorspoels et al., 2003; Xiang et al., 2007). Concentration ratios of BDE-153 to BDE-154 were also calculated by Xiang et al., and similar results were found, suggesting that BDE-153 to BDE-154 ratio also reflected the metabolism ability of aquatic species (Xiang et al., 2007). For comparison in terrestrial environment, the concentration ratios of BDE-99 to BDE-100, in the present study, for earthworms were significantly lower ($p < 0.05$; Mann-Whitney U test), with a mean ratio of 72:28, than the ratios in soils (mean 80:20) and biosolids (83:17). Similar behavior was detected for BDE-153 to BDE-154 ratios ($p < 0.01$; Mann-Whitney U test), with a mean concentration of 45:55 for earthworms, 60:40 for soils and 61:31 for biosolids, which may indicate that earthworms are capable of metabolizing BDE-99 and BDE-153. These results were corroborated with calculated BAFs. Bioaccumulation factors for BDE-100 (14) and BDE-154 (4.1) were higher than those for BDE-99 (11) and BDE-153 (2.5). A similar pattern was observed in the aquatic worm *Lumbriculus variegatus*, showing BAFs for BDE-100 (9.9) and –154 (9.1) higher than for BDE-99 (4.0) and –153 (4.7) (Ciparis and Hale, 2005). Besides, the depuration rate constants calculated in *L. variegatus* for BDE-100 and –154 were lower than that for BDE-99 and likely BDE-153, suggesting that ortho-substituted congeners are eliminated more slowly and consequently, are more bioaccumulative than meta-substituted ones (Ciparis and Hale, 2005).

4. Conclusions

Multi species soil systems (MS-3) were used to assess the fate and the effects associated with the application of biosolids in agricultural soil on terrestrial soil organisms. The study of 49 emerging organic compounds, 20 PFASs and 29 HFRs, in biosolids, biosolids-amended soils and earthworms exposed to these soils demonstrates the presence and transfer of these pollutants in the soil-biota system. The biosolid application contributed to the increase of perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants in soil and to their bioaccumulation in earthworms. To the best of our knowledge, this study is the first to compare the bioaccumulation behavior of PFASs and HFRs in earthworms exposed to biosolids-amended soils. Results showed a higher bioaccumulation potential in earthworms for PFASs followed by CFRs and PBDEs. The differences in bioaccumulation of the pollutants in earthworms suggest a different bioavailability of the compounds in the soil. The characteristics of soil, the physiology and habitat of organisms and mainly the physicochemical properties of the chemicals could have an important role in the migration of the compounds through the soil food web.

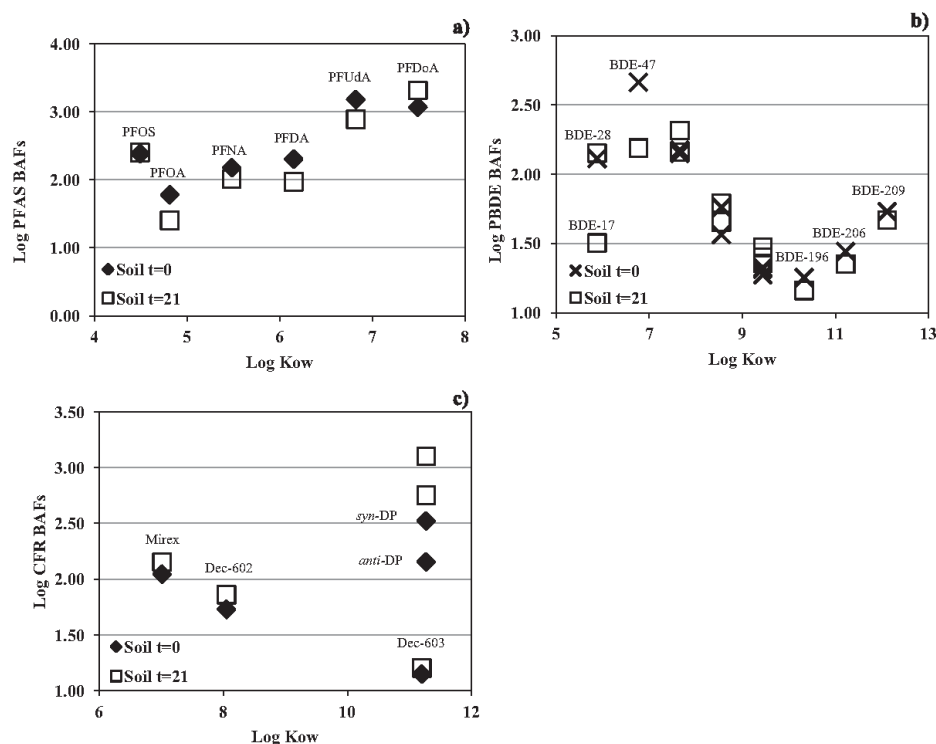


Fig. 3. Relationship of the BAFs of PFASs (a), PBDEs (b) and chlorinated flame retardants, CFRs, (c) in earthworms with their log K_{ow} . Data expressed as Log BAF represent $1 + \log(1 + \text{BAF})$ and BAF represents mean values. BAFs were calculated as ratio between earthworm concentrations after exposed in the soil for 21 days and soil concentration at the beginning and the end of the experiment (both on a dry weight basis). Log K_{ow} used were calculated by EPI Suite 4.1. For clarity, BAF values for BDE-197 and BDE-207 are not shown.

Acknowledgements

The present work has been funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project numbers CTM2010-19779-C02-01 and CTM2010-19779-C02-02).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.004>.

References

- Bischel, H.N., Macmanus-Spencer, L.A., Luthy, R.G., 2010. Noncovalent interactions of long-chain perfluoroalkyl acids with serum albumin. *Environ. Sci. Technol.* 44, 5263–5269.
- Carbonell, G., Pro, J., Gómez, N., Babín, M.M., Fernández, C., Alonso, E., Tarazona, J.V., 2009. Sewage sludge applied to agricultural soil: ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1309–1319.
- Ciparis, S., Hale, R.C., 2005. Bioavailability of polybrominated diphenyl ether flame retardants in biosolids and spiked sediment to the aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 916–925.
- De Boer, J., Wester, P.G., van der Horst, A., Leonards, P.E.G., 2003. Polybrominated diphenyl ethers in influents, suspended particulate matter, sediments, sewage treatment plant and effluents and biota from the Netherlands. *Environ. Pollut.* 122, 63–74.
- De la Torre, A., Sverko, E., Alae, M., Martínez, M.A., 2011a. Concentrations and sources of dechlorane plus in sewage sludge. *Chemosphere* 82, 692–697.
- De la Torre, A., Alonso, E., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2011b. Sources and behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in Spanish sewage sludge. *Waste Manag.* 31, 1277–1284.
- De la Torre, A., Alonso, M.B., Martínez, M.A., Sanz, P., Shen, L., Reiner, E.J., Lailson-Brito, J., Torres, J.P.M., Bertozzi, C., Marigo, J., Barbosa, L., Cremer, M., Secchi, E., Malm, O., Eljarrat, E., Barceló, D., 2012a. Dechlorane-related compounds in Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from Southeastern and Southern Coast of Brazil. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12364–12372.
- De la Torre, A., Concejero, M.A., Martínez, M.A., 2012b. Concentrations and sources of an emerging pollutant, decabromodiphenylethane (DBDPE), in sewage sludge for land application. *J. Environ. Sci.* 24, 558–563.
- De Wit, C.A., 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46, 583–624.
- EEC, 1986. Council directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture (86/278/EEC). *Official Journal of the European Communities* No. L 181/6–12, Brussels.
- EEC, 1991. Council directive of 21 May 1991 concerning urban waste water treatment (91/271/EEC). *Official Journal of the European Communities* No. L 135/40–52, Brussels.
- Fernández, C., Alonso, C., Babín, M.M., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V., 2004. Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multi-species soil systems. *Sci. Total Environ.* 323, 63–69.
- Giesy, J.P., Kannan, K., 2001. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1339–1342.
- Hansen, K.J., Clemen, L.A., Ellefson, M.E., Johnson, H.O., 2001. Compound-specific, quantitative characterization of organic fluorochemicals in biological matrices. *Environ. Sci. Technol.* 35, 766–770.
- Hatzinger, P.B., Alexander, M., 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29, 537–545.
- He, M., Luo, X., Wu, J., Chen, S., Wei, S., Mai, B., 2014. Isomers of dechlorane plus in an aquatic environment in a highly industrialized area in Southern China: spatial and vertical distribution, phase partition, and bioaccumulation. *Sci. Total Environ.* 481, 1–6.

- Higgins, C.P., Field, J.A., Criddle, C.S., Luthy, R.G., 2005. Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3946–3956.
- Hoff, P.T., Vijver, K.V.D., Dongen, W.V., Esmans, E.L., Blust, R., Coen, W.M.D., 2003. Perfluorooctane sulfonic acid in bib (*Trisopterus luscus*) and plaice (*Pleuronectes platessa*) from the Western Scheldt and the Belgian North Sea: distribution and biochemical effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 608–614.
- Hoh, E., Zhu, L., Hites, R.A., 2006. Dechlorane plus, a chlorinated flame retardant, in the Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 2006, 1184–1189.
- Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2006. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: a review. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3463–3473.
- Jager, T., Van der Wal, L., Fleuren, R.H.L.J., Barendregt, A., Hermens, J.L.M., 2005. Bioaccumulation of organic chemicals in contaminated soils: evaluation of bioassays with earthworms. *Environ. Sci. Technol.* 39, 293–298.
- Kang, J., Kim, J., Jin, G., Park, H., Baek, S., Chang, Y., 2010. Detection of dechlorane plus in fish from urban-industrial rivers. *Chemosphere* 79, 850–854.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., 2006. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa- and deca-PBDE technical flame-retardant mixture. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6247–6254.
- Lasier, P.J., Washington, J.W., Hassan, S.M., Jenkins, T.M., 2011. Perfluorinated chemicals in surface waters and sediments from the Conasauga, Oostanaula, and Coosa rivers and their bioaccumulation in the aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2194–2201.
- Law, K., Halldorson, T., Danell, R., Stern, G., Gewurtz, S., Alae, M., Marvin, C., Whittle, M., Tommy, G., 2006. Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a Lake Winnipeg (Canada) food web. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2177–2186.
- Law, R.J., Alae, M., Allchin, C.R., Boon, J.P., Lebeuf, M., Lepom, P., Stern, G.A., 2003. Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife. *Environ. Int.* 29, 757–770.
- Liang, X., Zhu, S., Chen, P., Zhu, L., 2010. Bioaccumulation and bioavailability of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in soil. *Environ. Pollut.* 158, 2387–2392.
- Loi, E.H., Leo, W.Y., Taniyasu, S., Lam, P.K.S., Kannan, K., Yamashita, N., 2011. Trophic magnification of poly- and perfluorinated compounds in a subtropical food web. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5506–5513.
- Luross, J.M., 2002. Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers and polybrominated biphenyls in lake trout from the Laurentian Great Lakes. *Chemosphere* 46, 665–672.
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003. Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 196–204.
- Navarro, I., Sanz, P., Martínez, M.A., 2011. Analysis of perfluorinated alkyl substances in Spanish sewage sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1277–1286.
- Sellström, U., De Wit, C.A., Lundgren, L., Tysklind, M., 2005. Effect of sewage-sludge application on concentrations of higher-brominated diphenyl ethers in soils and earthworms. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9064–9070.
- Shoeib, M., Harner, T., Ikonou, M., Kannan, K., 2004. Indoor and outdoor air concentrations and phase partitioning of perfluoroalkyl sulfonamides and polybrominated diphenyl ethers. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1313–1320.
- Sijm, D., Kraaij, R., Belfroid, A., 2000. Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environ. Pollut.* 108, 113–119.
- Sverko, E., Tomy, G.T., Reiner, E.J., Li, Y., McCarry, B.E., Arnot, J.A., Law, R.J., Hites, R.A., 2011. Dechlorane plus and related compounds in the environment: a review. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5088–5098.
- Tomy, G.T., Pleskach, K., Ismail, N., Whittle, D.M., Helm, P.A., Sverko, E., Zaruk, D., Marvin, C.H., 2007. Isomers of dechlorane plus in Lake Winnipeg and Lake Ontario food webs. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2249–2254.
- Voorspoels, S., Covaci, A., Schepens, P., 2003. Polybrominated diphenyl ethers in marine species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary: levels, profiles, and distribution. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4348–4357.
- Voorspoels, S., Covaci, A., Lepom, P., Jaspers, V.L.B., Schepens, P., 2006. Levels and distribution of polybrominated diphenyl ethers in various tissues of birds of prey. *Environ. Pollut.* 144, 218–227.
- Wang, D.G., Yang, M., Qi, H., Sverko, E., Ma, W.L., Li, Y.F., Alae, M., Reiner, E.J., Shen, L., 2010. An Asia-specific source of dechlorane plus: concentration, isomer profiles, and other related compounds. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6608–6613.
- Washington, J.W., Yoo, H., Ellington, J.J., Jenkins, T.M., Libelo, E.L., 2010. Concentrations, distribution and persistence of perfluoroalkylates in sludge-applied soils near Decatur, Alabama, USA. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8390–8396.
- Wen, B., Huang, R., Wang, P., Zhou, Y., Shan, X., Zhang, S., 2011. Effect of complexation on the accumulation and elimination kinetics of cadmium and ciprofloxacin in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4339–4345.
- Wen, B., Zhang, H., Li, L., Hu, X., Liu, Y., Shan, X., Zhang, S., 2015. Bioavailability of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in biosolids-amended soils to earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere* 118, 361–366.
- Xiang, C., Luo, X., Chen, S., Yu, M., Mai, B., Zeng, E., 2007. Polybrominated diphenyl ethers in biota and sediments of the Pearl River Estuary, South China. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 616–623.
- Xiao, K., Wang, P., Zhang, H., Shang, H., Li, Y., Li, X., Ren, D., Chen, W., Zhang, Q., 2013. Levels and profiles of dechlorane plus in a major e-waste dismantling area in China. *Environ. Geochem. Health* 35, 625–631.
- Yu, M., Luo, X., Wu, J., Chen, S., Mai, B., 2009. Bioaccumulation and trophic transfer of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in biota from the Pearl River Estuary, South China. *Environ. Int.* 35, 1090–1095.
- Zhao, S., Zhu, L., Liu, L., Liu, Z., Zhang, Y., 2013. Bioaccumulation of perfluoroalkyl carboxylates (PFCAs) and perfluoroalkane sulfonates (PFASs) by earthworms (*Eisenia fetida*) in soil. *Environ. Pollut.* 179, 45–52.
- Zhao, S., Fang, S., Zhu, L., Liu, L., Liu, Z., Zhang, Y., 2014. Mutual impacts of wheat (*Triticum aestivum* L.) and earthworms (*Eisenia fetida*) on the bioavailability of perfluoroalkyl substances (PFASs) in soil. *Environ. Pollut.* 184, 495–501.

Title

Bioaccumulation of emerging organic compounds (perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants) by earthworm in biosolid amended soils.

Authors

Irene Navarro^{a,*}, Adrián de la Torre^a, Paloma Sanz^a, Javier Pro^b, Gregoria Carbonell^b, María de los Ángeles Martínez^a

^aPersistent Organic Pollutants Group. Department of Environment, CIEMAT, Avda. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain.

^bLaboratory for Ecotoxicology. Department of the Environment, INIA, Crta. La Coruña km 7.5, 28040 Madrid. Spain.

*Corresponding author: Tel: +34 91 346 61 43. Fax: +34 91 346 62 69. E-mail address: i.navarro@ciemat.es (I. Navarro).

Contents

Table S1.- Concentrations of PFASs and HFRs in 16 biosolids analyzed.

Table S2.- Concentrations of PFASs and HFRs in the four biosolids selected for MS-3 experiment.

Table S3.- Concentrations (ng/g d.w.) of PFASs and HFRs in biosolid amended soils (at initial time and the end of the experiment) and earthworms. Bioaccumulation factors (BAFs) for the different compounds.

Fig S1.- Biosolid-amended soil-control soil ratios for PFASs (a), PBDEs (b), DP and related compounds (c).

Table S1.- Concentrations (ng/g d.w.) of PFASs and HFRs in 16 biosolids analyzed.

	PFBS	PFHxS	PFOS	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA
B-1	N.D.	N.D.	10.8	N.D.	N.D.	N.D.	3.21	N.D.	2.47
B-2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.17	N.D.	2.66
B-3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.74	N.D.	6.38
B-4	N.D.	N.D.	3.95	N.D.	32.2	N.D.	8.27	1.93	5.15
B-5	5.08	N.D.	14.5	N.D.	N.D.	N.D.	1.07	N.D.	0.79
B-6	N.D.	14.9	33.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B-7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	13.8	5.19	18.3
B-8	N.D.	2.17	46.3	3.67	N.D.	N.D.	5.66	N.D.	6.87
B-9	N.D.	N.D.	8.17	N.D.	N.D.	N.D.	0.99	N.D.	0.63
B-10	N.D.	6.27	19.1	7.28	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.25
B-11	N.D.	N.D.	83.5	N.D.	4.65	2.15	14.0	1.51	13.3
B-12	N.D.	N.D.	8.88	N.D.	N.D.	N.D.	9.79	N.D.	9.08
B-13	5.37	N.D.	8.27	N.D.	N.D.	N.D.	9.27	4.74	9.67
B-14	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.20
B-15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B-16	12.7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.81	N.D.	0.54
Range	N.D. - 12.7	N.D. - 14.9	N.D. - 83.5	N.D. - 7.28	N.D. - 32.2	---	N.D. - 14.0	N.D. - 5.19	N.D. - 18.3
Mean	7.72	7.78	23.7	5.47	18.4	---	6.23	3.34	5.67
SD	4.32	6.50	24.8	2.55	19.4	---	4.72	1.89	5.37

N.D.: not detected. PFBA, FOSA, *N*-MeFOSA and *N*-EtFOSA were not detected in any samples.

Table S1.-: Continued.

	BDE-17	BDE-28	BDE-47	BDE-66	BDE-85	BDE-99	BDE-100	BDE-138
B-1	N.D.	0.03	1.29	N.D.	N.D.	1.45	0.37	N.D.
B-2	0.04	0.11	9.51	N.D.	0.58	17.1	3.91	0.17
B-3	0.04	0.10	4.30	N.D.	N.D.	5.54	1.16	N.D.
B-4	0.05	0.12	4.76	0.12	0.23	7.10	1.30	0.13
B-5	0.03	0.13	8.04	N.D.	0.34	11.3	2.21	0.03
B-6	0.03	0.09	4.67	0.07	N.D.	6.63	1.39	N.D.
B-7	N.D.	0.09	4.06	0.04	N.D.	5.49	1.06	0.04
B-8	N.D.	0.17	7.41	N.D.	N.D.	9.19	1.96	N.D.
B-9	N.D.	N.D.	5.21	0.10	N.D.	7.26	1.54	N.D.
B-10	N.D.	0.09	4.54	N.D.	N.D.	6.92	1.38	N.D.
B-11	N.D.	0.46	10.9	0.16	N.D.	14.1	3.11	0.10
B-12	N.D.	0.14	7.82	0.14	N.D.	10.1	2.23	0.09
B-13	N.D.	0.23	10.7	N.D.	N.D.	13.8	3.34	0.13
B-14	N.D.	0.17	1.57	0.10	N.D.	1.86	0.31	N.D.
B-15	N.D.	0.20	6.00	0.09	N.D.	10.7	2.30	N.D.
B-16	N.D.	0.35	6.68	0.26	N.D.	9.52	1.68	N.D.
Range	N.D. - 0.05	N.D. - 0.46	1.29 - 10.9	N.D. - 0.26	N.D. - 0.58	1.45 - 17.1	0.31 - 3.91	N.D. - 0.17
Mean	0.04	0.16	6.09	0.12	0.38	8.63	1.83	0.10
SD	0.01	0.11	2.86	0.06	0.18	4.25	1.00	0.05

Table S1.-: Continued.

	BDE-153	BDE-154	BDE-183	BDE-184	BDE-196	BDE-197	BDE-206	BDE-207	BDE-209	Σ PBDEs
B-1	0.23	0.17	0.17	N.D.	0.40	0.95	2.02	3.63	29.3	40.0
B-2	2.26	1.83	0.84	0.07	0.98	0.97	10.3	10.7	366	425
B-3	0.77	0.57	0.69	0.06	1.80	2.65	5.29	17.4	130	171
B-4	1.27	0.71	1.46	0.07	2.81	2.26	38.1	41.1	1312	1414
B-5	1.38	1.06	1.22	0.05	0.67	0.82	11.7	8.23	300	348
B-6	0.96	0.68	0.82	0.05	0.77	0.81	16.2	8.49	511	553
B-7	0.62	0.54	0.61	0.03	0.34	1.08	2.68	2.94	32.3	52.0
B-8	1.29	0.83	1.44	0.05	0.87	1.02	11.0	7.56	611	654
B-9	0.82	0.70	0.68	0.05	1.60	1.01	4.24	8.20	111	142
B-10	1.04	0.65	0.84	N.D.	0.66	0.74	10.8	5.67	545	579
B-11	1.82	1.37	2.26	0.09	3.50	2.29	18.4	31.1	309	398
B-12	1.22	0.99	0.94	0.12	1.07	0.98	10.5	9.07	144	189
B-13	1.66	1.37	1.50	0.12	1.20	1.45	23.1	16.0	673	748
B-14	0.60	0.26	1.58	N.D.	0.61	0.66	3.90	3.67	16.1	31.4
B-15	2.54	1.19	5.15	N.D.	1.59	1.79	10.3	7.92	100	150
B-16	2.26	0.95	3.26	N.D.	1.88	1.88	7.58	8.57	65.2	110
Range	0.23 - 2.54	0.17 - 1.83	0.17 - 5.15	N.D. - 0.12	0.34 - 3.50	0.66 - 2.65	2.02 - 38.1	2.94 - 41.1	16.1 - 1312	31.4 - 1414
Mean	1.30	0.87	1.47	0.07	1.30	1.34	11.6	11.9	328	375
SD	0.66	0.43	1.23	0.03	0.88	0.64	9.13	10.4	343	361

Table S1.-: Continued.

	<i>anti</i> -DP	<i>syn</i> -DP	Σ DP	f_{anti}	Dec 602	Dec 603	CP
B-1	1.63	0.65	2.28	0.72	N.D.	0.04	N.D.
B-2	2.54	1.18	3.71	0.68	0.01	0.10	N.D.
B-3	20.9	8.49	29.4	0.71	0.004	0.05	N.D.
B-4	2.87	1.22	4.09	0.70	0.02	0.15	0.01
B-5	8.37	3.33	11.7	0.72	0.02	0.07	N.D.
B-6	15.8	2.16	17.9	0.88	0.01	0.11	N.D.
B-7	13.0	4.12	17.1	0.76	0.10	0.04	N.D.
B-8	10.5	3.55	14.0	0.75	0.02	0.08	N.D.
B-9	16.1	7.30	23.4	0.69	0.004	0.02	N.D.
B-10	7.76	3.16	10.9	0.71	0.01	0.09	N.D.
B-11	7.42	2.95	10.4	0.72	0.01	0.05	N.D.
B-12	39.4	12.4	51.8	0.76	0.01	0.06	N.D.
B-13	22.7	7.47	30.2	0.75	0.02	0.07	N.D.
B-14	7.74	1.66	9.40	0.82	0.02	0.10	N.D.
B-15	11.3	3.43	14.7	0.77	0.01	0.05	N.D.
B-16	10.3	3.98	14.3	0.72	0.02	0.07	N.D.
Range	1.63 - 39.4	0.65 - 12.4	2.28 - 51.8	0.68 - 0.88	N.D. - 0.10	0.02 - 0.15	---
Mean	12.39	4.19	16.6	0.74	0.02	0.07	---
SD	9.41	3.18	12.4	0.05	0.02	0.03	---

N.D.: not detected. BDE-77, -119, -156, -191, Dec 604 and Mirex were not detected in any samples.

Table S2.- Concentrations (ng/g d.w.) of PFASs and HFRs in the four biosolids selected (n=3; mean \pm SD) for MS-3 experiment.

	W-1	W-2	W-3	W-4
PFBS	N.D.	N.D.	N.D.	2.05 \pm 0.36
PFOS	14.6 \pm 5.25*	28.2 \pm 2.19*	64.4 \pm 7.87*	0.65 \pm 0.30*
PFDS	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFBA	N.D.	34.3 \pm 10.2	N.D.	5.74 \pm 0.89
PFPeA	2.03 \pm 0.70	2.11 \pm 0.11	3.35 \pm 1.11	2.29 \pm 0.41
PFHxA	0.92 \pm 0.65*	4.77 \pm 0.37*	5.34 \pm 0.25*	1.78 \pm 0.32*
PFHpA	0.64 \pm 0.12*	0.85 \pm 0.14*	1.44 \pm 0.33*	0.80 \pm 0.04*
PFOA	3.65 \pm 0.35*	8.90 \pm 0.13*	9.37 \pm 0.19*	2.52 \pm 0.24*
PFNA	0.55 \pm 0.02*	2.58 \pm 1.03*	1.25 \pm 0.27*	0.73 \pm 0.21*
PFDA	3.46 \pm 0.67*	19.0 \pm 0.61*	7.55 \pm 0.62*	0.64 \pm 0.02*
PFUdA	0.58 \pm 0.05*	2.57 \pm 0.37*	0.99 \pm 0.17*	0.17 \pm 0.05*
PFDoA	0.66 \pm 0.12	2.20 \pm 0.53*	0.92 \pm 0.37	0.17 \pm 0.08*
PFTTrDA	0.21 \pm 0.08	1.22 \pm 0.37	N.D.	N.D.
PFTeDA	N.D.	5.97 \pm 3.90	2.20 \pm 0.11	N.D.
PFHxDA	N.D.	4.74 \pm 2.94	N.D.	N.D.
PFODA	N.D.	2.64 \pm 1.89	N.D.	N.D.
Σ PFASs	27.31 \pm 5.41*	120.02 \pm 15.86*	96.82 \pm 8.66*	17.55 \pm 1.11*
BDE-17	N.D.	0.09 \pm 0.02	0.10 \pm 0.02	0.05 \pm 0.003
BDE-28	0.03 \pm 0.01*	0.22 \pm 0.01*	0.44 \pm 0.03*	0.30 \pm 0.03*
BDE-47	1.29 \pm 0.05*	7.19 \pm 0.31*	9.05 \pm 0.18*	3.44 \pm 0.51*
BDE-66	N.D.	0.24 \pm 0.004	0.27 \pm 0.04	0.28 \pm 0.02
BDE-85	N.D.	0.42 \pm 0.06	0.48 \pm 0.05	0.29 \pm 0.03
BDE-99	1.45 \pm 0.07*	12.4 \pm 0.25 *	14.1 \pm 0.42*	7.87 \pm 0.52*
BDE-100	0.37 \pm 0.02*	2.36 \pm 0.04*	2.69 \pm 0.08*	1.36 \pm 0.07*
BDE-138	N.D.	0.10 \pm 0.08	0.14 \pm 0.04	0.18 \pm 0.06
BDE-153	0.23 \pm 0.01*	1.55 \pm 0.21*	1.96 \pm 0.12*	1.61 \pm 0.14*
BDE-154	0.17 \pm 0.01*	1.01 \pm 0.04*	1.42 \pm 0.15*	0.73 \pm 0.03*
BDE-183	0.17 \pm 0.02	1.91 \pm 0.03	2.46 \pm 0.14	3.29 \pm 0.31
BDE-184	N.D.	N.D.	0.09 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01
BDE-191	N.D.	N.D.	0.17 \pm 0.04	0.21 \pm 0.18
BDE-196	0.40 \pm 0.07	1.96 \pm 0.41	5.92 \pm 1.06	1.75 \pm 0.13
BDE-197	0.95 \pm 0.06	0.90 \pm 0.08	3.30 \pm 0.24	2.18 \pm 0.58
BDE-206	2.02 \pm 0.31*	14.8 \pm 1.21*	29.6 \pm 2.29*	5.79 \pm 0.98*
BDE-207	3.63 \pm 0.21*	10.4 \pm 0.44*	32.9 \pm 1.13*	8.60 \pm 0.46*
BDE-209	29.3 \pm 1.22*	277 \pm 21.0*	347 \pm 12.6*	130 \pm 8.68*
Σ PBDEs	40.0 \pm 2.13*	333 \pm 21.2*	452 \pm 15.5*	168 \pm 9.37*
DBDPE	N.D.	126 \pm 17.9	95.3 \pm 10.8	150 \pm 9.16
anti-DP	1.63 \pm 0.11*	10.7 \pm 1.31	8.99 \pm 1.07	4.10 \pm 0.11*
syn-DP	0.65 \pm 0.07*	3.89 \pm 0.22*	3.13 \pm 0.32*	1.35 \pm 0.06*
Σ DP	2.28 \pm 0.08	14.6 \pm 1.43	12.1 \pm 1.31	5.46 \pm 0.14*
f_{anti}	0.72 \pm 0.03	0.73 \pm 0.02	0.74 \pm 0.02	0.75 \pm 0.01
Dec 602	N.D.	0.01 \pm 0.01	0.005 \pm 0.001	0.003 \pm 0.001
Dec 603	0.04 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.04 \pm 0.001	0.11 \pm 0.04
CP	N.D.	0.01 \pm 0.005	0.004 \pm 0.002	0.004 \pm 0.001

N.D.: not detected.

PFHxS, PFDS, FOSA, *N*-MeFOSA, *N*-EtFOSA, BDE-77, -119, -156, Dec 604 and Mirex were not detected in any sample.* Data showed statistically significant differences ($p < 0.05$; Student's t-test) between selected biosolids.

Table S3.- Concentrations (ng/g d.w.) of PFASs and HFRs in biosolids-amended soils (at initial time and the end of the experiment) and earthworms. Bioaccumulation factors (BAFs) for the different compounds.

	PFBS	PFOS	PFBA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFDA	PFUdA	PFDoA	PFTTrDA	PFTeDA	Σ PFASs
Control													
Soil t=0	N.D.	N.D.	N.D.	0.22	N.D.	0.52	0.19	0.04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.97
Soil t=final	N.D.	0.16	N.D.	N.D.	0.05	N.D.	0.17	0.17	0.03	0.02	N.D.	N.D.	0.59
Earthworm	N.D.	1.33	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.43	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.76
BAF	---	8.55	---	---	---	---	2.39	---	---	---	---	---	2.25
Treatment-1													
Soil t=0	N.D.	0.38	N.D.	N.D.	N.D.	0.47	0.41	0.15	N.D.	0.05	N.D.	N.D.	1.47
Soil t=final	0.17	0.31	0.22	N.D.	0.10	0.06	0.32	0.27	0.03	0.05	N.D.	N.D.	1.54
Earthworm	N.D.	10.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.43	1.89	1.68	8.54	4.74	9.86	37.71
BAF	---	30.3	---	---	---	---	1.17	8.95	50.5	171	---	---	25.07
Treatment-2													
Soil t=0	N.D.	0.55	0.13	0.05	0.06	0.11	0.27	0.21	0.04	N.D.	N.D.	N.D.	1.42
Soil t=final	N.D.	0.65	0.31	0.21	0.35	0.09	1.42	0.47	0.06	0.06	N.D.	N.D.	3.63
Earthworm	N.D.	16.8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.44	7.92	6.46	26.0	17.8	22.5	99.86
BAF	---	28.1	---	---	---	---	2.89	23.3	123	402	---	---	39.56
Treatment-3													
Soil t=0	N.D.	0.55	0.82	0.15	N.D.	0.27	0.21	0.06	0.06	0.04	N.D.	N.D.	2.16
Soil t=final	0.14	0.61	N.D.	N.D.	0.08	0.06	0.33	0.21	0.06	0.03	N.D.	N.D.	1.49
Earthworm	N.D.	14.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.63	N.D.	2.93	N.D.	3.82	21.84
BAF	---	24.9	---	---	---	---	---	4.76	---	82.9	---	---	11.97
Treatment-4													
Soil t=0	N.D.	0.32	0.90	0.11	N.D.	0.41	0.23	0.06	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.04
Soil t=final	0.19	0.21	N.D.	0.08	0.09	0.04	0.22	0.14	0.01	0.02	N.D.	N.D.	0.99
Earthworm	N.D.	2.85	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.93	N.D.	2.46	1.34	2.29	9.88
BAF	---	10.7	---	---	---	---	---	9.21	---	138	---	---	6.53

N.D.: not detected.

PFHxS, PFDS, PFHxDA, PFODA, FOSA, *N*-MeFOSA and *N*-EtFOSA were not detected in any sample.

Table S3.-: Continued.

	BDE-17	BDE-28	BDE-47	BDE-66	BDE-85	BDE-99	BDE-100	BDE-119	BDE-138	BDE-153
Control										
Soil t=0	N.D.	0.002	0.13	0.003	N.D.	0.08	0.03	N.D.	N.D.	0.05
Soil t=final	N.D.	0.01	0.20	0.01	N.D.	0.19	0.05	N.D.	N.D.	0.11
Earthworm	0.01	0.01	0.14	N.D.	N.D.	0.05	0.04	N.D.	N.D.	0.02
BAF	---	1.32	0.84	---	---	0.33	1.04	---	---	0.21
Treatment-1										
Soil t=0	N.D.	0.01	0.04	0.01	N.D.	0.30	0.09	N.D.	N.D.	0.12
Soil t=final	N.D.	0.004	0.21	0.01	0.01	0.24	0.05	N.D.	N.D.	0.11
Earthworm	0.03	0.06	3.36	N.D.	N.D.	3.20	1.19	N.D.	0.08	0.41
BAF	---	12.7	26.9	---	---	12.0	17.0	---	---	3.57
Treatment-2										
Soil t=0	N.D.	0.01	0.29	0.01	0.01	0.35	0.07	N.D.	0.01	0.13
Soil t=final	N.D.	0.01	0.31	0.01	0.01	0.31	0.07	N.D.	0.02	0.11
Earthworm	0.03	0.10	4.91	N.D.	N.D.	4.56	1.45	N.D.	N.D.	0.37
BAF	---	13.7	16.4	---	---	13.9	20.3	---	---	3.03
Treatment-3										
Soil t=0	N.D.	0.01	0.05	0.01	N.D.	0.31	0.09	N.D.	N.D.	0.14
Soil t=final	0.004	0.01	0.33	0.01	0.01	0.36	0.07	N.D.	0.02	0.14
Earthworm	0.03	0.13	4.86	N.D.	N.D.	4.77	1.53	N.D.	N.D.	0.46
BAF	8.41	18.4	25.8	---	---	14.4	18.8	---	---	3.32
Treatment-4										
Soil t=0	N.D.	0.02	0.17	N.D.	N.D.	0.40	0.15	N.D.	N.D.	0.45
Soil t=final	0.003	0.01	0.38	0.01	0.01	0.44	0.09	N.D.	0.01	0.17
Earthworm	0.03	0.11	4.41	N.D.	N.D.	5.42	1.28	N.D.	N.D.	0.66
BAF	10.0	6.94	16.2	---	---	12.8	10.6	---	---	2.12

Table S3.-: Continued.

	BDE-154	BDE-183	BDE-184	BDE-191	BDE-196	BDE-197	BDE-206	BDE-207	BDE-209	Σ PBDEs
Control										
Soil t=0	0.04	0.28	N.D.	0.04	0.46	0.28	1.55	1.32	7.24	11.5
Soil t=final	0.07	0.15	0.03	0.03	0.18	0.07	0.32	0.31	5.48	7.19
Earthworm	0.03	0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.14	0.23	6.85	7.52
BAF	0.59	0.10	---	---	---	---	0.15	0.28	1.08	0.80
Treatment-1										
Soil t=0	0.09	0.20	0.03	N.D.	0.24	0.30	0.30	0.52	5.22	7.45
Soil t=final	0.10	0.15	0.03	0.04	0.30	0.21	0.40	0.53	9.06	11.5
Earthworm	0.45	0.23	0.04	0.06	0.18	0.20	0.50	0.49	34.4	44.8
BAF	4.84	1.30	1.38	1.35	0.65	0.79	1.43	0.93	4.81	4.74
Treatment-2										
Soil t=0	0.11	0.19	0.03	0.03	0.32	0.23	0.21	0.48	8.50	11.0
Soil t=final	0.09	0.19	0.03	0.03	0.33	0.26	0.39	0.57	9.86	12.6
Earthworm	0.41	0.21	0.04	0.06	0.16	0.16	0.24	0.26	32.1	45.0
BAF	4.14	1.11	1.51	1.74	0.48	0.64	0.80	0.51	3.50	3.82
Treatment-3										
Soil t=0	0.08	0.22	0.04	0.02	0.22	0.27	0.38	0.68	5.41	7.93
Soil t=final	0.10	0.27	0.04	0.04	0.60	0.37	1.54	1.46	14.0	19.4
Earthworm	0.51	0.27	0.05	0.10	0.22	0.18	0.40	0.48	35.2	49.2
BAF	5.64	1.10	1.30	3.40	0.54	0.57	0.42	0.45	3.62	3.60
Treatment-4										
Soil t=0	0.14	1.80	0.13	N.D.	0.16	0.98	0.57	1.79	28.5	35.2
Soil t=final	0.09	0.26	0.03	0.04	0.41	0.33	0.50	0.71	10.4	13.9
Earthworm	0.61	0.41	0.05	0.10	0.16	0.17	2.29	1.53	59.1	76.3
BAF	5.27	0.39	0.69	2.69	0.56	0.26	4.27	1.22	3.04	3.11

Table S3.-: Continued.

	DBDPE	<i>anti</i>-DP	<i>syn</i>-DP	Σ DP	<i>f_{anti}</i>	Dec 602	Dec 603	CP	Mirex
Control									
Soil t=0	1.6	0.54	0.05	0.59	0.91	0.0001	N.D.	N.D.	0.08
Soil t=final	0.95	0.22	0.03	0.25	0.88	0.0001	N.D.	0.0002	0.02
Earthworm	N.D.	0.16	0.07	0.23	0.71	N.D.	N.D.	N.D.	0.05
BAF	---	0.42	1.75	0.54	---	---	---	---	1.08
Treatment-1									
Soil t=0	N.D.	0.83	0.03	0.85	0.97	0.001	0.003	N.D.	0.03
Soil t=final	0.61	0.21	0.38	0.59	0.36	0.0003	0.002	0.0004	0.01
Earthworm	N.D.	1.11	1.24	2.35	0.47	0.001	N.D.	N.D.	N.D.
BAF	---	2.13	6.05	3.26	---	3.69	---	---	---
Treatment-2									
Soil t=0	3.73	0.63	0.19	0.82	0.77	0.0002	0.01	0.0002	0.03
Soil t=final	1.73	1.02	0.29	1.31	0.78	0.0002	0.01	0.0003	0.08
Earthworm	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.001	0.002	N.D.	0.27
BAF	---	---	---	---	---	5.61	0.37	---	5.10
Treatment-3									
Soil t=0	0.44	0.95	0.03	0.98	0.97	0.001	0.005	0.001	0.05
Soil t=final	2.27	0.18	N.D.	0.18	1.00	0.0002	0.002	0.0003	0.04
Earthworm	N.D.	1.35	0.71	2.06	0.66	0.001	0.001	N.D.	0.17
BAF	---	2.39	23.7	3.56	---	2.37	0.28	---	4.11
Treatment-4									
Soil t=0	16.41	0.67	0.25	0.92	0.73	0.0002	0.01	0.0005	0.05
Soil t=final	4.90	0.16	0.03	0.19	0.86	0.0002	0.01	0.0004	0.03
Earthworm	N.D.	24.8	6.60	31.4	0.79	0.002	0.01	N.D.	0.83
BAF	---	59.9	47.1	56.9	---	0.96	0.95	---	4.54

N.D.: not detected.

BDE-77, -119, -156, were not detected in any sample.

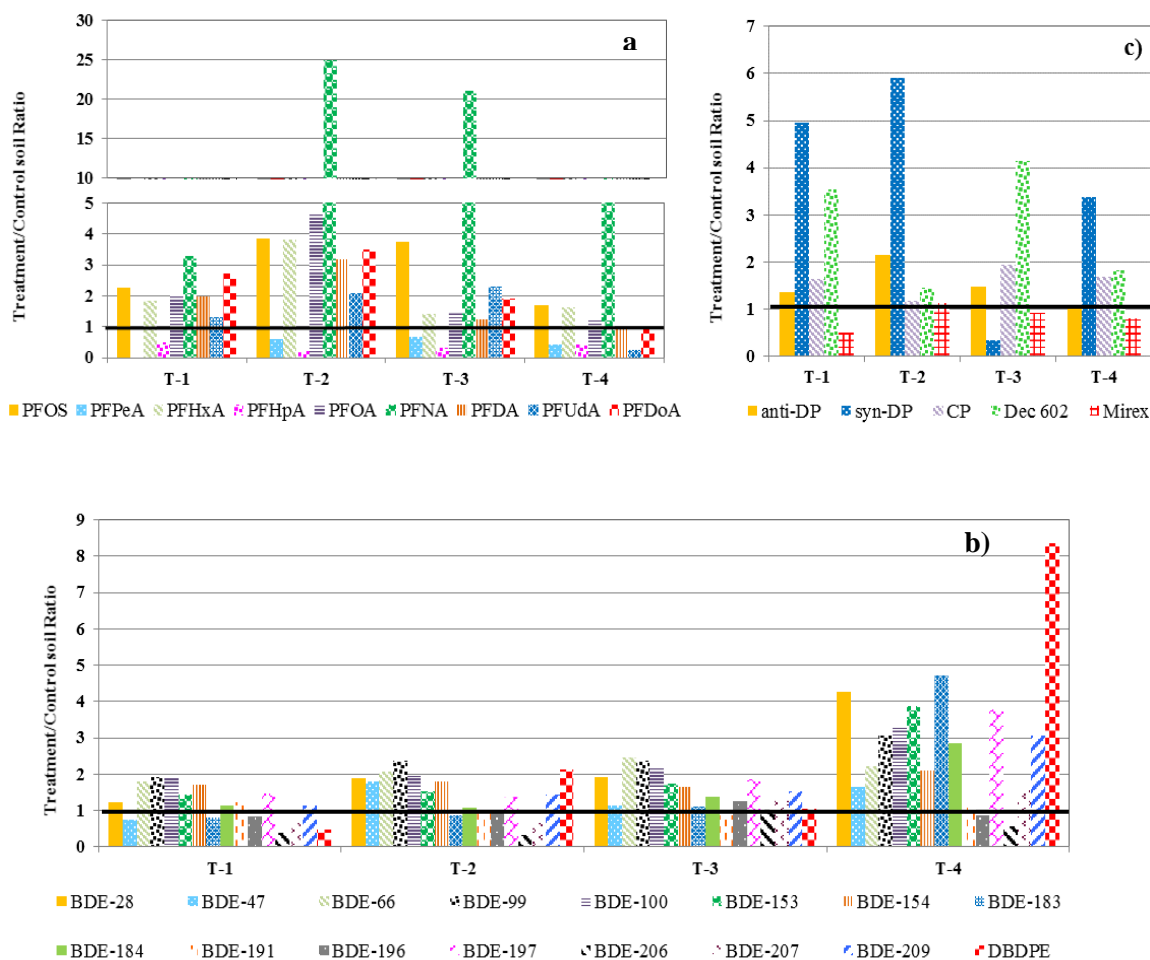


Fig S1.- Biosolid-amended soil/control soil ratios for PFASs (a), PBDEs (b), DP and related compounds (c). The ratio showing no difference (ratio = 1) is indicated as a darker horizontal line.

ANEXO V

Artículo IV

Uptake of perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants by crop plants grown in biosolids-amended soils.

Irene Navarro, Adrián de la Torre, Paloma Sanz, Miguel Ángel Porcel, Javier Pro, Gregoria Carbonell, María de los Ángeles Martínez.

Environmental Research (2017) 152: 199-206.



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envres

Uptake of perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants by crop plants grown in biosolids-amended soils

Irene Navarro^{a,*}, Adrián de la Torre^a, Paloma Sanz^a, Miguel Ángel Porcel^b, Javier Pro^b,
 Gregoria Carbonell^b, María de los Ángeles Martínez^a

^a Persistent Organic Pollutants Group, Department of Environment, CIEMAT, Avda. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain

^b Laboratory for Ecotoxicology, Department of the Environment, INIA, Crta. La Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Perfluoroalkyl substances
 Polybrominated diphenyl ethers
 Biosolid
 Transfer factors
 Earthworm

ABSTRACT

The bioaccumulation behavior of perfluoroalkyl substances (PFASs) and halogenated flame retardants (HFRs) was examined in three horticultural crops and earthworms. Two species, spinach (*Spinacia oleracea*) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.), were grown in field soil amended with a single application of biosolids (at agronomic rate for nitrogen), to represent the scenario using commercial biosolids as fertilizer, and the third crop, corn (*Zea mays*) was grown in spiked soil (~50 mg PFOS/kg soil, ~5 mg Deca-BDE/kg soil and a mixture of both, ~50 mg PFOS and ~5 mg Deca-BDE/kg soil) to represent a worst-case scenario. To examine the bioaccumulation in soil invertebrates, earthworms (*Eisenia andrei*) were exposed to the spiked soil where corn had been grown. PFASs and HFRs were detected in the three crops and earthworms. To evaluate the distribution of the compounds in the different plant tissues, transfer factors (TFs) were calculated, with TF values higher for PFASs than PBDEs in all crop plants: from 2 to 9-fold in spinach, 2 to 34-fold in tomato and 11 to 309-fold in corn. Bioaccumulation factor (BAF) values in earthworms were also higher for PFASs (4.06 ± 2.23) than PBDEs (0.02 ± 0.02).

1. Introduction

Recycling biosolids on land is recognized internationally as the most sustainable option for managing the residual sludge from urban wastewater treatment (European Economic Community, 1986, 1991a). The substantial nitrogen, phosphorus and organic carbon contained in biosolids make the spreading of this waste material on land as a crop fertilizer or an organic soil amendment suitable. An estimated 40% of the sewage sludge produced in Europe is used as a fertilizer in agriculture (European Commission, 2010). However, the recycling rates of sludge to agriculture vary greatly among European Union (EU) Member States. For example, about 1,205,000 t (dry solid) of sludge were produced in Spain during 2010, and about 995,000 t (dry solid) were recycled to agriculture, equivalent to 82% of the sludge produced (Eurostat, 2015).

Degradation and attenuation during wastewater and sludge treatment remove significant amounts of organic pollutants (Clarke and Smith, 2011). However, many of those have lipophilic properties and may be present in sewage sludges in remaining concentrations. Particular attention concerning emerging organic contaminants such as perfluoroalkyl substances (PFASs) and halogenated flame retardants

(HFRs) has been given due to their widespread distribution in the environment, toxicity, and potential for bioaccumulation (Braune et al., 2014; Wen et al., 2015). The presence of PFASs and HFRs as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their alternatives decabromodiphenyl ethane (DBDPE), decolorane plus (DP) and related compounds, in waste material have been documented in some countries (De la Torre et al., 2011a; Navarro et al., 2011; Ricklund et al., 2009; Sun et al., 2011). However, there is still a lack of information regarding their behavior and occurrence in the environment, but in recent years the interest in these compounds has greatly increased. For example, PFASs and PBDEs, due to their presence in biosolids, were assessed as emerging organic contaminants of potential concern for land application (Clarke and Smith, 2011). In that study, PFASs were the first compounds identified for priority attention for presenting properties that make them theoretically possible to enter human food-chain from biosolids-amended soil. Organisms are liable to take up organic contaminants and may accumulate high levels of them when they live in contaminated soil environments. Once organic compounds are introduced to the environment, two of the primary concerns for human health are the capacity for contamination of water and food. The migration of chemicals from soil to plants could facilitate a

* Corresponding author.

E-mail address: i.navarro@ciemat.es (I. Navarro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.10.018>

Received 7 June 2016; Received in revised form 4 October 2016; Accepted 19 October 2016
 0013-9351/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

probable entry pathway into the food chain (Lechner and Knapp, 2011; Stahl et al., 2009, 2013; Felizeter et al., 2014). Plant uptake and distribution have been shown to be dependent on the physical-chemical properties of the chemicals, the soil and irrigation water characteristics, and the plant species and physiology, including properties such as lipid or water content and transpiration rates (Felizeter et al., 2012; Wen et al., 2013; Krippner et al., 2014; Wang et al., 2014). The study of the uptake of PFASs and HFRs by different crop plants grown in waste-amended soils provides a starting point for assessing the possible risks related to applications of biosolids to agricultural soils. Besides, organic contaminants can be taken up by organisms that live in direct contact with contaminated soil, such as soil invertebrates. The bioaccumulation of pollutants by these organisms implies a risk for earthworm population and many vertebrate species which feed on earthworms. Earthworms consume large amounts of soil and their thin cuticle is in almost constant contact with soil. If an organic contaminant is bioavailable and bioaccumulates in earthworms, it will enter the terrestrial food chain, as earthworms are eaten by many organisms from higher trophic levels. Therefore, earthworms have become common model organisms for testing toxicity and bioavailability of contaminants in soil, especially for organic compounds.

Few studies have been published detailing the behavior of organic pollutants in crops after application of contaminated sewage sludge to agricultural land. There are works describing the uptake of PFASs and PBDEs by plants in nutrient solution experiments (Felizeter et al., 2014; Krippner et al., 2014; Wang et al., 2011), from soil to plants (Stahl et al., 2009; Lechner and Knapp, 2011; Huang et al., 2011; Wang et al., 2014) from biosolids-amended soils (Yoo et al., 2011; Wen et al., 2014) and directly from undiluted biosolids (Vrskoslavová et al., 2010). These studies showed that plant accumulation of organic compounds could be dose-dependent and varied with plant species. Organofluorine compounds behave very differently to the organobromines and have unusual partitioning properties. The physical properties and molecular structures of the different compounds will likely have different effects on their accumulation in plants. Yet, although the land application of biosolids is regulated and a target value for the sum of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) of 100 µg/kg dry mass has been established in Germany for agriculturally used sewage sludge, no EU legislation is currently in place with respect to PFASs and HFRs in biosolids (Grümping et al., 2007). Consequently, continued vigilance is required to monitor and determine the significance and implications of emerging organic compounds in land-applied biosolids.

To address this need, the main objectives of this study were: (1) to determine the transfer, bioaccumulation and distribution of selected emerging organic compounds such as PFASs, PBDEs, Dechloranes (602, 603, 604, and DP), Chlordane Plus (CP) and Mirex from biosolids-amended soil to spinach (*Spinacia oleracea*) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant under agronomic conditions. (2) to study the uptake, bioaccumulation and distribution of PFOS and BDE-209 in corn (*Zea mays*) plants under a worst case scenario. (3) to determine pollutants bioaccumulation in earthworm (*Eisenia andrei*) from contaminated soil. To the best of our knowledge, this is the first study examining PFAS uptake in spinach, PBDEs in spinach and tomato and DP uptake in crops from biosolids-amended soils.

2. Materials and methods

2.1. Study design

Three sorts of plants were chosen: spinach (*Spinacia oleracea*), tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and corn (*Zea mays*). In spinach and tomato transfer experiments, two different organic wastes were applied to soil: anaerobically digested thermal drying sludge (W1) and anaerobically digested municipal solid waste compost (W2). The physicochemical characteristics of the soil and the two biosolids used

are detailed in Table S1. Waste application rates were calculated by considering the nitrogen requirement of plants and restrictions established in the Council Directive 91/676/EEC: spinach (120 kg N/ha) and tomato (150 kg N/ha) (European Economic Community, 1991b). To represent a worst-case scenario, soils fortified by the addition of PFOS (~50 mg/kg soil, T1), Deca-BDE (~5 mg/kg soil, T2), and a mixture of both commercial mixtures (~50 and ~5 mg/kg for PFOS and Deca-BDE, respectively, T3) were used to cultivate corn plants. The experiments were performed in a climate controlled room with a light:dark cycle (16:8 h), temperature (21 ± 1 °C), humidity (55–60%), and irrigation (100 mL/d=1000 mm/year) controlled conditions. In the spinach and corn cases the growth period consisted of 28 days, while tomato plants were exposed to amended soils for six months (time needed to reach fruiting). A total of 72 pots were used, 24 pots for each crop test (spinach, tomato and corn). Eight replicates per treatment were used for spinach and tomato whereas six replicates were used for corn. Control pots (not amended/fortified soil) and fertilizer-free pots were also prepared. After the corn experiment, ten earthworms (*Eisenia andrei*) per treatment were added to soils and a 28 days exposure study was also performed. More details are given in Supplementary material.

2.2. Sample preparation

Waste and soil samples were air-dried and processed according to methods reported previously (De la Torre et al., 2011a, 2011b, 2012; Navarro et al., 2011). Earthworms were allowed to depurate for 24 h to avoid the presence of soil particulates that could interfere with the bioaccumulation study. Plant material and earthworms were frozen and freeze-dried at low temperature (~−50 °C) for 24 h in a lyophilizer (Cryodos-50, Telstar Instrument). PFASs from spinach, tomato, corn and earthworm samples were extracted with acetonitrile by agitation, ultrasonication and centrifugation techniques. EnviCarb SPE cartridges were used to purify the extracts. For HFR determination, plant material and earthworm samples were Soxhlet extracted with hexane/acetone (50:50, v/v) and hexane/dichloromethane (50:50, v/v), respectively. Purification was accomplished using a sulphuric acid digestion and a silica column. Fractionation step was then performed in an automated purification Power Prep™ System (FMS Inc., USA). Detailed information is given in Supplementary material.

2.3. Instrumental analysis

PFASs were determined by HPLC-MS/MS (Varian 212 Liquid Chromatograph coupled to a Varian 320 triple quadrupole MS). The chromatographic separation was carried out in an ACE C18-PFP (50×2.1 mm, 3 µm) analytical column. PBDEs were analyzed by LRMS (Agilent 6890 Gas Chromatograph connected to an Agilent 5973 MSD) for wastes and soils but in the case of biotic samples (spinach, tomato, corn and earthworms) the sensitivity of the HRMS (Micromass Autospec Ultima) was needed. In both cases chromatographic separation was performed with short and narrow capillary column (15 m×0.25 mm i.d.×0.10 µm film thickness; DB5 MS from J & W Scientific, Folsom CA). Dechlorane compounds were analyzed by ECNI-MS (Agilent 5973MSD) using methane as a reagent gas. Complete details of instrumental method are described elsewhere (De la Torre et al., 2011a, 2011b; Navarro et al., 2011), see Supplementary material.

2.4. Quality assurance

Procedural blanks were processed and analyzed with every batch of samples under the same conditions. In addition, instrumental blanks consisting of methanol or nonane were run before each sample injection to check for memory effects and contamination from the LC and GC system. In the case of PFASs determination, to avoid any

contamination, any contact with fluoropolymers was prevented at all times and polytetrafluoroethylene material was avoided during sample treatment and analysis. Mean recoveries (mean \pm SD) were: 76 \pm 28% (PFASs), 84 \pm 21% (PBDEs) and 103 \pm 6% (DP). Limits of detection (LODs), defined as the concentration giving a signal to noise ratio greater than 3 were in the range of 0.01–0.90 ng/g for PFASs, 2.1–7.9 pg/g for PBDEs, 0.1 pg/g for DBDPE and 0.1–1.2 pg/g for dechlorane related compounds (Table S2).

2.5. Calculations and statistical evaluation

Transfer factors (TFs) were used to evaluate the compound-specific uptake by plants. Accumulation or transfer factors are commonly used to assess the bioavailability and bioconcentration of chemicals from media such as water, soil or sediments (Yoo et al., 2011; Felizeter et al., 2014). The knowledge of these factors could help to deduce the potential toxicological risk related to vegetables grown in soils with pollutant content. TFs were calculated by division of the amount found in the plant tissue on a dry weight basis (ng/g d.w.) by the concentration determined in the soil on a dry weight basis (ng/g d.w.). Transfer factors between plant parts were also calculated for each compound to evaluate their translocation within the tomato plant: root to leaf concentration factors (LCF; ratio between the concentration found in leaf, ng/g d.w., and the concentration detected in root, ng/g d.w.) and leaf to fruit or edible part concentration factors (ECF; ratio between the amount found in fruit, ng/g d.w., and the concentration determined in leaf, ng/g d.w.). The translocation of the compounds to the fruit was evaluated by the ratio between leaf to fruit concentrations instead of stem to fruit concentrations, because the material for the fruit development is provided by the phloem sap, which is produced in the leaves (Felizeter et al., 2014). Therefore, it is to be expected that compounds reach the fruits primarily via phloem sap and their transfer to the fruit could be assessed by their ECF value.

Bioaccumulation factors (BAF) in earthworms were calculated by division of the amount found in earthworms (ng/g d.w.) by concentrations determined in soil (ng/g d.w.; soil t=final).

Statistical analyses were conducted with the software SPSS 23.0 for Windows. Data were tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. Student's *t*-tests were also performed to evaluate differences between compound groups. Statements regarding differences in this study are based on a significance level of $p < 0.05$. Linear regressions were established to detect correlations and checked by Spearman test.

3. Results and discussion

3.1. Uptake of PFASs, PBDEs and DP by spinach plant

Concentrations in wastes, soils (at initial time and the end of the experiment) and spinach plants are detailed in Table 1. Total concentrations in the anaerobically digested thermal drying sludge (W1) – 105.43 ng/g d.w. (PFASs), 333.33 ng/g d.w. (PBDEs), 14.57 ng/g d.w. (DP) – were higher than those detected in the anaerobically digested municipal solid waste compost (W2) – 17.54 ng/g d.w. (PFASs), 167.98 ng/g d.w. (PBDEs), 5.45 ng/g d.w. (DP) –. Total concentrations in amended soils were also higher in the treatment-1 (T1) than treatment-2 (T2) for PFASs (6.24–0.94 ng/g d.w., T1–T2), but similar for PBDEs (10.57–9.78 ng/g d.w., T1–T2) and DP (0.11–0.14 ng/g d.w., T1–T2). PFASs, PBDEs and DP were detected in spinach plants growing in the waste-amended soils. Total concentrations for PFASs in spinach were 1.72 ng/g d.w., 5.33 ng/g d.w. and 0.99 ng/g d.w. for control, T1 and T2, respectively. Lower values were detected for PBDEs: 0.27 ng/g d.w., 0.48 ng/g d.w. and 0.43 ng/g d.w. for the different treatments, respectively. In the case of DP, total concentrations were 2.27 ng/g d.w., 2.40 ng/g d.w. and 2.21 ng/g d.w., respectively. The fraction of *syn*-DP (f_{syn}) was defined as the concentration

of *syn*-DP divided by the total DP. f_{syn} value in soil (0.34 \pm 0.04; mean \pm SD) closely resembles the one reported for OxyChem's technical DP mixture (f_{syn} =0.35) (Tomy et al., 2007). Nevertheless, this value decreases to 0.14 \pm 0.03 in the spinach plant. This result could be attributed to the isomer-specific uptake of DP from the soil by the plants or the difference in physicochemical properties of *anti*- and *syn*-DP (Sverko et al., 2008).

Percentage distributions of the PFASs, PBDE congeners and DP found in the spinach plants in the different treatments are shown in Fig. S1 and Table S3. PFOS (29.1 \pm 10.5%; mean \pm SD) and *anti*-DP (41.1 \pm 13.4%; mean \pm SD) were present in higher proportions than the rest of the compounds. To further demonstrate compound-specific uptake by plants, transfer factors (TFs) were calculated and compared between compounds (Table S4). The obtained PFOS TF was 4.76 \pm 1.12, mean \pm SD. This value correlates well with other PFOS TFs reported in the literature for potato vegetative compartments (3.85) and carrot foliage (2.94) (Lechner and Knapp, 2011). As mentioned before, important differences were found for DP isomers, where the calculated TF for *anti*-DP (21.3 \pm 6.23) was higher than the one obtained for *syn*-DP (6.28 \pm 1.06). Values for PBDEs ranged from 0.23 to 2.68. Only BDE-47 and BDE-17 showed TF values higher than 1 (1.59 \pm 0.55 and 2.68 \pm 0.56, respectively). These results provide evidence that PFOS and DP (mainly *anti*-DP) are more liable to be taken up by spinach plants.

For nonionic organic chemicals the degree of uptake via plant roots seems to be inversely related to their hydrophobicity, which is often described by the octanol-water partition coefficient (K_{ow}) (McKone and Maddalena, 2007). Significant linear correlation ($n=16$, $R^2=-0.799$, $p < 0.01$, Spearman test) between transfer factor of the different treatments and log K_{ow} for PBDEs was found (Fig. S2). The TF value gradually declined with increasing log K_{ow} value. The higher brominated PBDEs with higher partition coefficients showed a more difficult soil-to-plant translocation.

3.2. Uptake and distribution of compounds in tomato plants

Concentrations in soils (at initial time and the end of the experiment) and different compartments of tomato plants are shown in Table 2 and Table S7. Mean concentrations for total PFASs, PBDEs, DBDPE and DP in soils after biosolid application were: 7.82–0.88 ng/g d.w., 10.5–11 ng/g d.w., 6.35–26.5 ng/g d.w. and 0.24–0.18 ng/g d.w. (T1–T2), respectively. As mentioned before, waste application rates were calculated considering nitrogen plant requirements (European Economic Community, 1991b), which at the end resulted in a relatively low pollutant content in the amended soils. However, levels of PFASs, PBDEs, DBDPE and DP were detected in different parts of this crop: indicating that the plant has the ability not only to take up these compounds from soils by roots, but also to translocate these compounds to the above-ground parts. Total concentrations for PFASs in tomato fruit were 61.3 \pm 8.04 ng/g d.w. and 3.47 \pm 1.55 ng/g d.w. (mean \pm SD) for T1 and T2, respectively. In the case of PBDEs, lower levels were detected: 10.77 \pm 6.61 ng/g d.w. and 11.27 \pm 0.89 ng/g d.w. for the two treatments, respectively. DP total concentrations were: 0.15 \pm 0.16 ng/g d.w. and 0.09 \pm 0.03 ng/g d.w. (T1 and T2). Similar to spinach soil, the mean f_{syn} value in tomato soil was 0.31 \pm 0.03, (mean \pm S.D.), close to the OxyChem's technical DP mixture. As described in the spinach experiments, an isomer-specific uptake of DP from the soil by the tomato plants could have happened (f_{syn} values in tomato plant were: 0.15 \pm 0.05 (root), 0.15 \pm 0.09 (stem), 0.15 \pm 0.03 (leaf) and 0.11 \pm 0.02 (fruit); mean \pm SD).

For characterization of the uptake and distribution of compounds in tomato plants, transfer factors within the plant were calculated. The mass distribution of the compounds in different plant tissues (Fig. 1) shows that PFOS (75%) and the long-chain perfluorinated carboxylic acids, PFCAs, (C7–C10: PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA) (54–96%) preferentially remained in roots and the short-chain PFCAs (C4–C6:

Table 1
Concentrations of PFASs and HFRs (ng/g d.w.) in wastes, soils and spinach plants.

	Control				Treatment-1				Treatment-2			
	Soil _{t=0}	Soil _{t=final}	Seedbed spinach	Spinach	Waste	Soil _{t=0}	Soil _{t=final}	Spinach	Waste	Soil _{t=0}	Soil _{t=final}	Spinach
PFBS	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.20	N.D.	2.05	N.D.	N.D.	N.D.
PFOS	0.29	0.29	N.D.	1.72	28.20	0.35	0.50	1.62	0.65	0.22	0.23	0.99
PFBA	0.40	0.03	N.D.	N.D.	34.25	0.45	0.90	N.D.	5.74	0.43	0.12	N.D.
PFPeA	0.14	N.D.	N.D.	N.D.	2.11	0.12	2.40	1.34	2.29	N.D.	0.10	N.D.
PFHxA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.77	0.15	2.12	N.D.	1.78	N.D.	0.13	N.D.
PFHpA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.85	N.D.	0.34	N.D.	0.80	N.D.	N.D.	N.D.
PFOA	0.20	0.13	N.D.	N.D.	8.90	0.19	2.73	2.37	2.52	0.18	0.23	N.D.
PFNA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.58	N.D.	0.18	N.D.	0.73	N.D.	N.D.	N.D.
PFDA	0.14	0.07	N.D.	N.D.	19.0	0.18	1.34	N.D.	0.64	0.13	0.11	N.D.
PFUdA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.57	N.D.	0.10	N.D.	0.17	N.D.	N.D.	N.D.
PFDoA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.20	N.D.	0.23	N.D.	0.17	N.D.	N.D.	N.D.
Σ PFASs	1.17	0.52	N.D.	1.72	105.43	1.44	11.04	5.33	17.54	0.96	0.92	0.99
BDE-17	0.01	0.01	N.D.	N.D.	0.09	0.01	0.01	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01
BDE-28	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.22	N.D.	0.01	0.01	0.30	N.D.	0.01	N.D.
BDE-47	0.11	0.06	N.D.	0.14	7.19	0.09	0.15	0.21	3.44	0.11	0.15	0.13
BDE-66	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.24	0.01	N.D.	N.D.	0.28	0.01	N.D.	N.D.
BDE-85	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.42	0.01	0.01	N.D.	0.29	0.01	0.01	N.D.
BDE-99	0.26	0.17	N.D.	0.06	12.42	0.23	0.31	0.10	7.87	0.27	0.31	0.27
BDE-100	0.06	0.04	N.D.	0.01	2.36	0.05	0.06	0.02	1.36	0.06	0.06	N.D.
BDE-138	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.10	0.01	N.D.	N.D.	0.18	N.D.	N.D.	N.D.
BDE-153	0.12	0.09	N.D.	0.05	1.55	0.11	0.12	0.04	1.61	0.13	0.12	0.01
BDE-154	0.09	0.08	N.D.	N.D.	1.01	0.07	0.08	0.02	0.73	0.08	0.08	0.02
BDE-183	0.17	0.15	N.D.	N.D.	1.91	0.18	0.22	0.07	3.29	0.23	0.22	N.D.
BDE-184	0.02	0.03	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	0.03	N.D.	0.06	0.03	0.03	N.D.
BDE-191	0.03	0.05	N.D.	N.D.	N.D.	0.04	0.03	N.D.	0.21	0.04	0.03	N.D.
BDE-196	0.29	0.26	N.D.	N.D.	1.96	0.26	0.31	N.D.	1.75	0.33	0.31	N.D.
BDE-197	0.21	0.47	N.D.	N.D.	0.90	0.22	0.56	N.D.	2.18	0.26	0.56	N.D.
BDE-206	0.37	0.45	N.D.	N.D.	14.78	0.35	0.43	N.D.	5.79	0.71	0.43	N.D.
BDE-207	0.40	0.47	N.D.	N.D.	10.38	0.49	0.60	N.D.	8.60	0.80	0.60	N.D.
BDE-209	8.63	8.07	N.D.	N.D.	277.8	10.44	5.63	N.D.	129.99	7.92	5.63	N.D.
Σ PBDEs	10.81	10.41	N.D.	0.27	333.33	12.59	8.56	0.48	167.98	11.00	8.56	0.43
DBDPE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	125.83	1.39	0.88	N.D.	149.46	0.58	0.88	N.D.
anti-DP	0.04	0.19	N.D.	1.91	10.68	0.10	0.05	2.15	4.1	0.15	0.05	1.90
syn-DP	0.03	0.11	N.D.	0.36	3.89	0.04	0.03	0.25	1.35	0.06	0.03	0.32
Σ DP	0.07	0.31	N.D.	2.27	14.57	0.14	0.08	2.40	5.45	0.20	0.08	2.21
f_{syn}	0.42	0.37	–	0.16	0.27	0.28	0.36	0.10	0.25	0.29	0.36	0.14
Dec 604	0.18	0.21	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.27	N.D.	N.D.	N.D.	0.27	N.D.

N.D.: not detected.

PFHxS, PFDS, PFTrDA, PFTrDA, PFHxDA, PFOA, FOSA, N-MeFOSA, N-EtFOSA, BDE-77, -119, -156, Dec 602, Dec 603, CP and Mirex were not detected in any sample.

PFBA, PFPeA, PFHxA tended to be translocated to above-ground tissues (leaf: 31–56%, and fruit: 32–48%). This predominant accumulation of long-chain PFASs in the roots and shorter-chain compounds in the vegetative compartments has also been detected in other studies conducted in tomato, zucchini and cabbage (Felizeter et al., 2014), corn (Krippner et al., 2014), wheat (Wen et al., 2014) and lettuce (Felizeter et al., 2012). Similar to the short-chain PFCAs, DBDPE (96%) and DP (65%) show higher preference for above-ground parts.

Transfer factors are detailed in Table S9. In general, TF values in tomato plants were higher for PFASs than HFRs. TF mean values for the root, stem, leaf and fruit were: 3.44–5.48–22.2–12.6 for PFASs, 2.50–0.16–0.89–1.76 for PBDEs and 1.44–0.38–0.48–0.59 for DP. TFs in roots showed values > 1, indicating that the uptake and accumulation in roots by the plant are effective. Besides, most of the compounds, except PFBA, PFPeA and PFHxA, show TF values in roots higher than in above-ground plant parts (Fig. S3). This could indicate that the transport of these three substances from the roots to aerial plant parts is more efficacious (Felizeter et al., 2012; Blaine et al., 2013; Krippner et al., 2014). TF values for PFASs calculated in fruit ranged from 0.06 to 51.5. The highest values were obtained for PFBA and PFPeA. This result is in agreement with that reported by Blaine et al. (2013) in the same species.

Transfer factors between plant parts (LCF and ECF) were also

calculated for each compound to evaluate their translocation and distribution within the tomato plant (Table S10). PFPeA, PFHxA, PFOA and DBDPE exhibited mean LCF values > 1 and PFPeA, BDE-17, BDE-28, BDE-47, BDE-154, BDE-206, BDE-207, BDE-209 and anti-DP showed mean ECF values > 1. These values could indicate a higher translocation of these compounds from other plant parts to leaves or fruits. To compare with the literature data, PFAS ECFs on fresh weight basis were calculated: the mean ECF was 0.01 for PFOS, 0.02 for PFBA, 0.09 for PFPeA and 0.04 for PFHxA. Felizeter et al. (2014) reported ECF values for PFASs in tomato: 0.03 for PFOS, 0.14 for PFBA, 0.48 for PFPeA and 0.46 for PFHxA. Although ECF values in our study were lower, ECF for PFOS was very similar. The highest ECF value obtained by Felizeter et al. was reported for PFPeA, which is also consistent with our results, indicating a higher uptake and translocation for this compound. To the best of our knowledge, no other studies have measured the uptake of HFRs in tomato.

Taking into account that K_{ow} could be considered as the main physicochemical property related to the uptake and bioaccumulation of these compounds by plants (McKone and Maddalena, 2007), the relationship between the translocation of the compounds in the plant (TF) and their hydrophobicity were examined (Fig. S4). In general, inverse relationships between transfer factors and log K_{ow} were observed. Significant correlations between TF and log K_{ow} were found

Table 2
Concentrations of Σ PFASs, Σ PBDEs and Σ DP (ng/g d.w.) in wastes, soils and tomato plants.

	Waste	Soil _{t=0}	Soil _{t=final}	Root	Stem	Leaf	Fruit
Σ PFASs							
Fertilizer-free plant	–	0.43	–	N.A.	1.78	35.97	0.03
Control	–	0.58 \pm 0.19	0.40 \pm 0.02	1.67 \pm 0.36	0.06 \pm 0.86	0.64 \pm 0.19	2.74 \pm 2.23
Treatment-1	105.43 \pm 8.34	7.82 \pm 1.60	9.17 \pm 0.90	26.75 \pm 15.88	26.84 \pm 4.17	96.50 \pm 41.35	61.30 \pm 8.04
Treatment-2	17.54 \pm 1.11	0.88 \pm 0.02	0.92 \pm 0.21	0.83 \pm 0.55	0.89 \pm 0.85	1.10 \pm 0.24	3.47 \pm 1.55
Σ PBDEs							
Fertilizer-free plant	–	3.89	–	N.A.	0.01	0.07	N.A.
Control	–	5.38 \pm 1.01	12.95 \pm 1.38	4.26 \pm 1.00	0.003 \pm 0.001	5.56 \pm 4.22	0.55 \pm 0.17
Treatment-1	333.33 \pm 21.22	10.47 \pm 0.62	8.99 \pm 2.44	0.92 \pm 0.85	0.002 \pm 0.001	11.57 \pm 12.03	10.77 \pm 6.61
Treatment-2	167.98 \pm 9.37	10.88 \pm 0.93	10.49 \pm 0.65	0.88 \pm 0.81	0.01 \pm 0.01	3.28 \pm 2.87	11.27 \pm 0.89
Σ DP							
Fertilizer-free plant	–	N.D.	–	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	–	0.13 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.28 \pm 0.09	0.06 \pm 0.01	0.07 \pm 0.03	0.07 \pm 0.04
Treatment-1	14.57 \pm 1.43	0.24 \pm 0.02	0.16 \pm 0.03	0.23 \pm 0.22	0.04 \pm 0.01	0.08 \pm 0.03	0.15 \pm 0.16
Treatment-2	5.45 \pm 0.14	0.18 \pm 0.03	0.24 \pm 0.05	0.05 \pm 0.09	0.03 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03
f_{syn}							
Fertilizer-free plant	–	–	–	N.A.	–	–	N.A.
Control	–	0.26 \pm 0.02	0.32 \pm 0.02	0.10 \pm 0.08	0.25 \pm 0.16	0.04 \pm 0.03	0.09 \pm 0.06
Treatment-1	0.27 \pm 0.02	0.29 \pm 0.03	0.25 \pm 0.06	0.12 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01	0.19 \pm 0.08	0.09 \pm 0.09
Treatment-2	0.25 \pm 0.01	0.33 \pm 0.01	0.36 \pm 0.08	0.23 \pm 0.01	–	0.22 \pm 0.07	0.16 \pm 0.05

Mean \pm SD (n=3); N.D.: not detected; N.A.: not available.

Σ PFASs: sum of PFBS, PFOS, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA and PFDoA. Σ PBDEs: sum of BDE-17, -28, -47, -66, -99, -100, -153, -154, -183, -184, -191, -196, -197, -206, -207 and -209. Σ DP: sum of anti-DP and syn-DP. Concentrations of individual compounds are detailed in [Supplementary material](#).

for PFASs in stem (N=28, $R^2=-0.837$, $p < 0.01$, Spearman test), leaf (N=26, $R^2=-0.682$, $p < 0.01$) and fruit (N=30, $R^2=-0.929$, $p < 0.01$), and for PBDEs in root (N=58, $R^2=-0.910$, $p < 0.01$) and stem (N=14, $R^2=-0.802$, $p < 0.01$). The results suggest that more hydrophobic compounds preferentially remained in roots and less hydrophobic compounds tended to be translocated from roots to above-ground tissues.

3.3. Uptake and distribution of compounds in corn

Concentrations of PFOS and BDE-209 in corn plants cultivated in spiked soils: T1 (~50 mg PFOS/kg soil), T2 (~5 mg Deca-BDE/kg soil), and T3 (~50+~5 mg/kg for PFOS and Deca-BDE) are detailed in

[Table 3](#) and [Table S11](#). High levels for PFBS, PFHxS, BDE-207 and BDE-206 were also detected. The presence of nonabrominated diphenyl ethers in Deca-BDE commercial mixtures has been well documented: 2% and 3% for BDE 207 and 206, respectively ([La Guardia et al., 2006](#)). The composition of BDE 207 and 206 in the soils was 2% and 2% for BDE 207 and 206, respectively, at the beginning of the experiment and 2% and 3% at the end of the experiment. This congener composition resembles that of the Deca-BDE formulation. These results also highlight that BDE-209 degradation is low under the experiment conditions. Presence of PFBS and PFHxS in PFOS technical mixture has been documented as sum of both compounds, approximately 1.5%, ([Stahl et al., 2013](#)). PFBS and PFHxS contribution to the total PFASs content in soils did not varied greatly from the beginning to

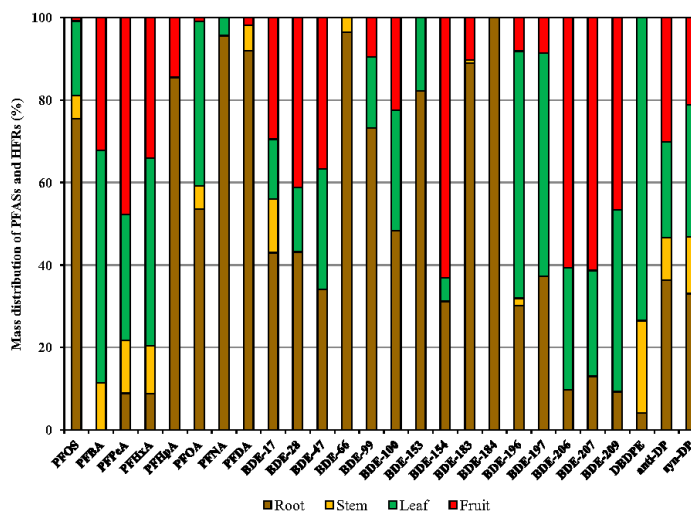


Fig. 1. Mass distribution (percentage of the total amount taken up by the plants) of PFASs and HFRs in different tissues of tomato plants.

Table 3

Concentrations of PFASs and PBDEs ($\mu\text{g/g}$ d.w.) in spiked soils, corn plants and earthworms. Accumulation factors in corn and earthworms.

	Soil _{t=0}	Soil _{t=final}	Root	Leaf	Earthworm	TF _{Root}	TF _{Leaf}	BAF _{Earthworm}
Treatment-1 (PFOS)								
PFBS	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.15 ± 0.05	0.12 ± 0.03	0.11	5.00 ± 1.03	4.00 ± 1.21	2.75
PFHxS	0.76 ± 0.16	0.94 ± 0.27	2.23 ± 0.24	7.98 ± 0.99	3.18	2.62 ± 0.28	9.39 ± 1.17	3.38
PFOS	38.5 ± 7.24	19.1 ± 8.49	254 ± 72.3	23.1 ± 6.13	74.3	8.82 ± 2.51	0.80 ± 0.21	3.89
Treatment-2 (Deca-BDE)								
BDE-206	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.001 ± 0.001	0.001	0.38 ± 0.08	0.01 ± 0.01	0.01
BDE-207	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.002 ± 0.001	0.002	0.50 ± 0.08	0.03 ± 0.01	0.03
BDE-209	3.76 ± 0.53	3.31 ± 0.41	1.12 ± 0.14	0.04 ± 0.01	0.021	0.32 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.01
Treatment-3 (PFOS+Deca-BDE)								
PFBS	N.D.	0.03 ± 0.02	N.D.	0.98 ± 0.42	0.07	–	–	2.33
PFHxS	0.53 ± 0.17	0.83 ± 0.20	1.28 ± 0.39	8.29 ± 2.86	2.93	1.88 ± 0.57	12.19 ± 4.21	3.53
PFOS	37.9 ± 5.34	13.9 ± 3.95	133 ± 52.6	24.8 ± 7.37	84.7	5.14 ± 2.03	0.96 ± 0.28	6.09
BDE-206	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.001 ± 0.001	0.002	0.50 ± 0.20	0.02 ± 0.01	0.04
BDE-207	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.001 ± 0.001	0.002	0.67 ± 0.27	0.02 ± 0.01	0.05
BDE-209	2.19 ± 0.40	1.61 ± 0.61	0.47 ± 0.07	0.01 ± 0.01	0.03	0.25 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.02

Mean ± SD (n=3); N.D.=not detected. Treatment-1: ~50 mg PFOS/kg soil, Treatment-2: ~5 mg Deca-BDE/kg soil and Treatment-3: ~50+~5 mg/kg PFOS and Deca-BDE.

TF_{Root}: Ratio between concentration in root and soil (mean soil t=0 and t=final). TF_{Leaf}: Ratio between concentration in leaf and soil (mean soil t=0 and t=final).BAF_{Earthworm}: Ratio between concentration in earthworm and soil (soil t=final).

the end of the experiment (< 1% in both cases for PFBS and from 2% to 5% for PFHxS). Then, PFOS degradation to PFBS and PFHxS was considered negligible.

Reduction rates of the PFOS and BDE-209 in the soils (comparing the concentrations in the soils before and after planting) ranged from 48% to 64% and 12% to 26%, respectively. The reduction of the latter corresponds well with values previously published for higher brominated PBDEs in contaminated soils in which corn plants were planted (from 13% to 18%) (Huang et al., 2011). The dissipation of PFOS and BDE-209 in the soils can be caused by several factors as degradation, volatilization and plant uptake. As in the spinach and tomato cases, corn experiments were conducted in closed enclosures (no wind) and under regulated temperature (21 ± 1 °C) and humidity (55 ± 5%) conditions. Considering this, influence of volatilization could be assumed low. Planting processes have been described as potential contributors to the pollutants dissipation in soils due to the microbial metabolism and bioestimulation of microbial communities (Huang et al., 2011). Accumulation of PFOS and BDE-209 in leaves may result from a combination of uptake through the soil-to-plant pathway and foliar uptake from the air. Leaf concentrations of plants growing in nonspiked soils were about 0.001 $\mu\text{g/g}$ for PFOS and BDE-209, accounting for less than 1% and 8% of the concentrations in the plants growing in spiked soils, respectively. This implies that there was no appreciable contribution from foliar uptake to leaf accumulation of PFOS and BDE-209 for this experiment.

The mass distribution of PFASs and PBDEs (percentage to total plant content) in different plant tissues was calculated to evaluate the translocation in the plant. Most of compounds presented a higher accumulation in roots: PFOS (89%), BDE-206 (97%), -207 (97%) and -209 (97%). However, PFBS (88%) and PFHxS (82%) were preferentially found in leaves. Transfer factors within corn plant were calculated for characterizing the distribution of compounds in the plants (see Table 3). TF mean values in roots considering all treatments ranked as follows: 6.98 (PFOS), 5.00 (PFBS), 2.25 (PFHxS), 0.58 (BDE-207), 0.44 (BDE-206) and 0.28 (BDE-209). TF mean values in leaves were: 10.79 (PFHxS), 4.00 (PFBS), 0.88 (PFOS), 0.03 (BDE-207), 0.01 (BDE-206) and 0.01 (BDE-209). TF values were also calculated based on the concentration of the compounds in spiked soils at the beginning and the end of the experiment (28 days). The TFs in roots of PFBS and PFHxS decreased 55% and 27% respectively, suggesting that the bioavailability of these pollutants in soil decreased as the time of their residence increased. Nevertheless, the effect of the aging time on the bioavailability of PFOS, BDE-206, BDE-207 and BDE-209 was not

observed.

TF values were higher for PFASs than PBDEs, these results indicate a higher translocation and bioaccumulation for PFOS from soil to the plant. In general, small and more apolar molecules can be dissolved in the lipid phase of the cell membrane and pass through it more easily. Several properties are decisive so as to a molecule could diffuse through a membrane: polarity, molecular size, functional groups and the position of the functional groups within the molecule (Krippner et al., 2014). Organic compounds could be taken up via passive (i.e. apolastic) process, which involves simple and facilitated diffusion, and/or active (i.e. symplastic) process, depending on the properties, the concentration of the compounds and the plant species (Zhan et al., 2010). The mechanism of PFOS and PFOA uptake by corn was examined by Wen et al. (2013). According to that, uptake of PFOS is carrier-mediated passive process, which may be conducted via aquaporins and anion channel in root cell membranes. They demonstrated that corn absorption of PFOS and PFOA may follow different pathways. PFOS and PFOA are PFASs, with similar perfluoroalkyl tail of varying chain length and different polar head group (sulfonate for PFOS and carboxylate for PFOA). Nevertheless, PBDE chemical structure is based on two aromatic rings where hydrogen atoms have been substituted by bromine atoms in different position. Due to their different chemical structures, properties and transfer factors obtained, it might be expected that PFOS and BDE-209 did not share a common uptake transport mechanism by the corn roots, but further studies should be conducted to clarify that.

3.4. Bioaccumulation in earthworms

Bioaccumulation in earthworm is detailed in the Table 3. High levels were also found in earthworms: PFBS (0.09 ± 0.03 $\mu\text{g/g}$ d.w., mean ± SD), PFHxS (3.06 ± 0.18 $\mu\text{g/g}$ d.w.), PFOS (79.50 ± 7.35 $\mu\text{g/g}$ d.w.), BDE-206 (0.002 ± 0.001 $\mu\text{g/g}$ d.w.), BDE-207 (0.002 $\mu\text{g/g}$ d.w.) and BDE-209 (0.03 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$ d.w.). Mean BAFs ranked as follows: 4.99 (PFOS), 3.46 (PFHxS), 2.54 (PFBS), 0.04 (BDE-207), 0.03 (BDE-206), and 0.01 (BDE-209). A calculation for the PBDE BAF on lipid weight basis for comparison with the literature data shows that the mean accumulation factors for earthworm were 0.43 (BDE-207), 0.26 (BDE-206), and 0.12 (BDE-209). These values are in accordance with data previously reported for earthworms: 1.54–4.12 (Wen et al., 2015) and 2.94–4.19 (Zhao et al., 2014) for PFOS and 0.07 (Gaylor et al., 2014) and 0.30 (Sellström et al., 2005) for BDE-209. Similar to PFAS behavior in corn plant, BAF values for PFASs are higher than those for

PBDEs, indicating a higher uptake and bioaccumulation for PFASs by earthworm.

The effect of the aging (28 days) on the bioavailability of the pollutants to earthworms in the spiked soils was also assessed. Similar to TFs calculated on soil basis at the beginning and the end of the experiment, the BAFs of PFBS and PFHxS declined 71% and 28% respectively. No evidences of the aging effect on the bioavailability of PFOS and the rest of PBDEs to earthworms were detected. Previously, the effect of aging (21 days) on the bioavailability of PFOS and BDE-209 to earthworms in biosolid amended soils was studied (Navarro et al., 2016). No significant differences on the bioavailability of PFOS, BDE-207 and BDE-209 were observed, which is consistent with that computed here.

4. Conclusions

Altogether 49 target emerging compounds, 29 HFRs and 20 PFASs, were determined to study the behavior and distribution in the soil-plant and soil-biota systems. To the best of our knowledge, this study is the first to look at PFAS uptake in spinach, PBDEs in spinach and tomato and DP uptake in crops from biosolids-amended soils, following recommended agronomic application rates. This study has demonstrated that the contamination of the soil with the emerging compounds studied, as a result of the biosolid application or pollution accident (worst case scenario), could be transferred to the plants via the roots into different plant tissues and to invertebrates in direct contact with the polluted soil. Transfer and bioaccumulation factors were higher for PFASs than PBDEs in all crop plants and earthworms, indicating a higher and more efficacious uptake, transport from the roots to aerial plant parts and bioaccumulation for the former. Regarding the translocation behavior of PFASs, a predominant accumulation of long-chain compounds in the roots and shorter-chain ones in the aerial plant organs was detected. The difference in uptake patterns of the crop assessed (spinach, tomato and corn) suggests that the type of crop and consequently, their vegetative structure, could have a significant importance in PFASs and HFRs transport through the tissues of the plant and bioaccumulation.

Further monitoring of these compounds is very important due to their bioaccumulation in different environmental compartments, including food chains, which could result in potential risks and organism exposure.

Acknowledgements

The present work has been funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project numbers CTM2010-19779-C02-01 and CTM2010-19779-C02-02).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.envres.2016.10.018.

References

- Blaine, A.C., Rich, C.D., Hundal, L.S., Lau, C., Mills, M.A., Harris, K.M., Higgins, C.P., 2013. Uptake of perfluoroalkyl acids into edible crops via land applied biosolids: field and greenhouse studies. *Environ. Sci. Technol.* 47, 14062–14069.
- Braune, B.M., Gaston, A.J., Letcher, R.J., Gilchrist, H.G., Mallory, M.L., Provencher, J.F., 2014. A geographical comparison of chlorinated, brominated and fluorinated compounds in seabirds breeding in the eastern Canadian Arctic. *Environ. Res.* 134, 46–56.
- Clarke, B.O., Smith, S.R., 2011. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ. Int.* 37, 226–247.
- De la Torre, A., Sverko, E., Alae, M., Martínez, M.A., 2011a. Concentrations and sources of dechlorane plus in sewage sludge. *Chemosphere* 82, 692–697.
- De la Torre, A., Alonso, E., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2011b. Sources and behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in Spanish sewage sludge. *Waste Manag.* 31, 1277–1284.
- De la Torre, A., Concejero, M.A., Martínez, M.A., 2012. Concentrations and sources of an emerging pollutant, decabromodiphenylethane (DBDPE), in sewage sludge for land application. *J. Environ. Sci.* 24, 558–563.
- European Economic Community, 1986. Council Directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture (86/278/EEC). Official Journal of the European Communities. No. L 181/6-12, Brussels.
- European Economic Community, 1991a. Council Directive of 21 May 1991 concerning urban waste water treatment (91/271/EEC). Official Journal of the European Communities. No. L 135/40-52, Brussels.
- European Economic Community, 1991b. Council Directive of 12 December 1991 concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources (91/676/EEC). Official Journal of the European Communities. No. L 375/1-8, Brussels.
- European Commission, 2010. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. Final Report - Part I: Overview Report, Report by Milieu Ltd WRC and RPA for the European Commission, DG Environment under Study Contract DG ENV.G.4/ETU/2008/0076r.
- Eurostat, 2015. Sewage sludge production and disposal from urban wastewater. Available at: (<http://ec.europa.eu/eurostat>).
- Feizeter, S., McLachlan, M.S., De Voogt, P., 2012. Uptake of perfluorinated alkyl acids by hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa*). *Environ. Sci. Technol.* 46, 11735–11743.
- Feizeter, S., McLachlan, M.S., De Voogt, P., 2014. Root uptake and translocation of perfluorinated alkyl acids by three hydroponically grown crops. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3334–3342.
- Gaylor, M.O., Mears, G.L., Harvey, E., La Guardia, M.J., Hale, R.C., 2014. Polybrominated diphenyl ether accumulation in an agricultural soil ecosystem receiving wastewater sludge amendments. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7034–7043.
- Grümping, R., Stegemann, D., Homburg, B., Petersen, M., Opel, M., 2007. Occurrence of perfluorinated chemicals (PFCs) in the sewage system of a large German city. *Organohalogen Compd.* 69, 2896–2899.
- Huang, H., Zhang, S., Christie, P., 2011. Plant uptake and dissipation of PBDEs in the soils of electronic waste recycling sites. *Environ. Pollut.* 159, 238–243.
- Krippner, J., Brunn, H., Falk, S., Georgii, S., Schubert, S., Stahl, T., 2014. Effects of chain length and pH on the uptake and distribution of perfluoroalkyl substances in maize (*Zea mays*). *Chemosphere* 94, 85–90.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., 2006. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used Penta-Octa and Deca-PBDE technical flame retardant mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6247–6254.
- Lechner, M., Knapp, H., 2011. Carryover of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) from soil to plant and distribution to the different plant compartments studied in cultures of carrots (*Daucus carota* ssp. *Sativus*), potatoes (*Solanum tuberosum*), and cucumbers (*Cucumis sativus*). *J. Agric. Food Chem.* 59, 11011–11018.
- McKone, T.E., Maddalena, R.L., 2007. Plant uptake of organic pollutants from soil: bioconcentration estimates based on models and experiments. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 2494–2504.
- Navarro, I., Sanz, P., Martínez, M.A., 2011. Analysis of perfluorinated alkyl substances in Spanish sewage sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1277–1286.
- Navarro, I., De la Torre, A., Sanz, P., Pro, J., Carbonell, G., Martínez, M.A., 2016. Bioaccumulation of emerging organic compounds (perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants) by earthworm in biosolid amended soils. *Environ. Res.* 149, 32–39.
- Ricklund, N., Kierkegaard, A., McLachlan, M.S., Wahlberg, C., 2009. Mass balance of decabromodiphenyl ethane and decabromodiphenyl ether in a WWTP. *Chemosphere* 74, 389–394.
- Sellström, U., De Wit, C.A., Lundgren, L., Tysklind, M., 2005. Effect of sewage-sludge application on concentrations of higher-brominated diphenyl ethers in soils and earthworms. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9064–9070.
- Stahl, T., Heyn, J., Thiele, H., Hühner, J., Failing, K., Georgii, S., Brunn, H., 2009. Carryover of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) from soil to plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 289–298.
- Stahl, T., Riebe, R.A., Falk, S., Failing, K., Brunn, H., 2013. Long-term lysimeter experiment to investigate the leaching of perfluoroalkyl substances (PFASs) and the carry-over from soil to plants: Results of a pilot study. *J. Agric. Food Chem.* 61, 1784–1793.
- Sun, H., Gerecke, A.C., Giger, W., Alder, A.C., 2011. Long-chain perfluorinated chemicals in digested sewage sludges in Switzerland. *Environ. Pollut.* 159, 654–662.
- Sverko, E.D., Tomy, G.T., Marvin, C.H., Zaruk, D., Reiner, E., Helm, P.A., Hill, B., McCarty, B.E., 2008. Dechlorane plus levels in sediment of the lower Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 42, 361–366.
- Tomy, G.T., Pleskiach, K., Ismail, N., Whittle, D.M., Helm, P.A., Sverko, E., Zaruk, D., Marvin, C.H., 2007. Isomers of dechlorane plus in Lake Winnipeg and Lake Ontario food webs. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2249–2254.
- Vrkošlavová, J., Demnerová, K., Macková, M., Zemanová, T., Macek, T., Hajslová, J., Pulkrabová, J., Hrádková, P., Stiborová, H., 2010. Absorption and translocation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by plants from contaminated sewage sludge. *Chemosphere* 81, 381–386.
- Wang, S., Zhang, S., Huang, H., Zhao, M., Lv, J., 2011. Uptake, translocation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in maize (*Zea mays* L.). *Chemosphere* 85, 379–385.
- Wang, Y., Luo, C., Li, J., Yin, H., Zhang, G., 2014. Influence of plants on the distribution

I. Navarro et al.

Environmental Research 152 (2017) 199–206

- and composition of PBDEs in soils of an e-waste dismantling area: evidence of the effect of the rhizosphere and selective bioaccumulation. *Environ. Pollut.* 186, 104–109.
- Wen, B., Li, L., Liu, Y., Zhang, H., Hu, X., Shan, X., Zhang, S., 2013. Mechanistic studies of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoic acid uptake by maize (*Zea mays* L. cv. TY2). *Plant Soil* 370, 345–354.
- Wen, B., Li, L., Zhang, H., Ma, Y., Shan, X.-Q., Zhang, S., 2014. Field study on the uptake and translocation of perfluoroalkyl acids (PFAAs) by wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in biosolids-amended soils. *Environ. Pollut.* 184, 547–554.
- Wen, B., Zhang, H., Li, L., Hu, X., Shan, X., Zhang, S., 2015. Bioavailability of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in biosolids-amended soils to earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere* 118, 361–366.
- Yoo, H., Washington, J.W., Jenkins, T.M., Ellington, J.J., 2011. Quantitative determination of perfluorochemicals and fluorotelomer alcohols in plants from biosolid-amended fields using LC/MS/MS and GC/MS. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7985–7990.
- Zhan, X., Ma, H., Zhou, L., Liang, J., Jiang, T., Xu, G., 2010. Accumulation of phenanthrene by roots of intact wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: passive or active uptake? *BMC Plant Biol.* 10, 52.
- Zhao, S., Fang, S., Zhu, L., Liu, L., Liu, Z., Zhang, Y., 2014. Mutual impacts of wheat (*Triticum aestivum* L.) and earthworms (*Eisenia fetida*) on the bioavailability of perfluoroalkyl substances (PFASs) in soil. *Environ. Pollut.* 184, 495–501.

Supplementary material for

Uptake of perfluoroalkyl substances and halogenated flame retardants by crop plants grown in biosolids-amended soils.

Irene Navarro^{a,*}, Adrián de la Torre^a, Paloma Sanz^a, Miguel Ángel Porcel^b, Javier Pro^b, Gregoria Carbonell^b, María de los Ángeles Martínez^a

^aPersistent Organic Pollutants Group. Department of Environment, CIEMAT, Avda. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain.

^bLaboratory for Ecotoxicology. Department of the Environment, INIA, Crta. La Coruña km 7.5, 28040 Madrid. Spain.

*Corresponding author: Tel: +34 91 346 61 43. Fax: +34 91 346 62 69. E-mail address: i.navarro@ciemat.es

Contents

S.1. Materials and Methods

S1.1. Standards and reagents

S1.2. Study design

S1.3. Sample preparation

S1.4. Instrumental analysis

Table S1.- Physicochemical characterization of the soil and biosolids used in tomato and spinach experiments.

Table S2.- Limits of detection (LODs) of PFASs and HFRs.

Fig. S1.- Percentage distribution profiles (%) of the PFASs, PBDE congeners and DP detected in the spinach plants.

Table S3.- Detail of the individual compound percentage distribution (%) in the spinach plants

Table S4.- Transfer factors (TFs) for the different compounds in the spinach experiment.

Fig. S2.- Relationship between transfer factor in spinach and log K_{ow} for PBDEs.

Table S5.- Concentrations of PFASs and HFRs (ng/g w.w.) in spinach plant.

Table S6.- Log K_{ow} calculated by EPISuite 4.1 and comparison with various hydrophobicity parameters.

Table S7.- Concentrations of PFASs and HFRs (ng/g d.w.) in wastes, soils and different compartments of tomato plants.

Table S8.- Concentrations of PFASs and HFRs (ng/g w.w.) in tomato fruit.

Table S9.- Transfer factors of PFASs and HFRs in the different tomato plant tissues.

Fig. S3.- Transfer factors of PFASs in the different tomato plant tissues.

Table S10.- Transfer factors of PFASs and HFRs between plant parts: LCF and ECF.

Fig. S4.- Relationship between transfer factor in roots, stem, leaf and fruit for PFASs and HFRs and log K_{ow} .

Table S11. Concentrations of PFASs and HFRs in corn plant (ng/g w.w.) and earthworm (ng/g w.w or ng/g l.w.).

References

S1. Materials and Methods

S1.1. Standards and reagents

Analysis of PFASs (perfluorobutanesulfonate -PFBS-, perfluorohexanesulfonate -PFHxS-, perfluorooctanesulfonate -PFOS-, perfluorodecanesulfonate -PFDS-, perfluorobutanoic acid -PFBA-, perfluoropentanoic acid -PFPeA-, perfluorohexanoic acid -PFHxA-, perfluoroheptanoic acid -PFHpA-, perfluorooctanoic acid -PFOA-, perfluorononanoic acid -PFNA-, perfluorodecanoic acid -PFDA-, perfluoroundecanoic acid -PFUdA-, perfluorododecanoic acid -PFDoA-, perfluorotridecanoic acid -PFTrDA-, perfluorotetradecanoic acid -PFTeDA-, perfluorohexadecanoic acid -PFHxDA-, perfluorooctadecanoic acid -PFODA-, perfluorooctanesulfonamide -FOSA-, *N*-methyl perfluorooctanesulfonamide -*N*-MeFOSA- and *N*-ethyl perfluorooctanesulfonamide -*N*-EtFOSA-), PBDEs (IUPAC congener numbers: BDE-17, -28, -47, -66, -77, -85, -99, -100, -119, -138, -153, -154, -156, -183, -184, -191, -196, -197, -206, -207, -209), DBDPE and DP were performed by isotopic dilution using labelled ^{13}C , ^{18}O or deuterated standard solutions: MPFAC-MXA, *N*-d₃-MeFOSA, *N*-d₅-EtFOSA, $^{13}\text{C}_9$ -PFNA, MBDE-MXE and BDE-CVS-EISS were purchased from Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Canada) and MDP (containing $^{13}\text{C}_{10}$ -*syn*-DP and $^{13}\text{C}_{10}$ -*anti*-DP) from Cambridge Isotope Laboratories. Inc. (Andover, MA, USA). Dec 602 (CAS# 31107-44-5), Dec 603 (CAS# 13560-91-4) and Dec 604 (CAS# 34571-16-9) were obtained from Toronto Research Chemical Inc. (Toronto, ON, Canada).

EnviCarb cartridges (500 mg, 6 mL) were provided from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) and Oasis WAX cartridges (500 mg, 6 mL) from Waters (Milford, MA, USA).

Other chemicals used as anhydrous sodium sulphate, copper fine powder, sulphuric acid (95–97%) and solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and toluene) for organic trace analysis were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium acetate, ammonium hydroxide, sodium acetate, siliceous earth extrapure, acetic acid, methanol, acetonitrile were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

S1.2. Study design

Three fertilization conditions in soil were compared in the experiments:

1. Fertilizer-free or natural soil: soil without any support of nitrogen or fertilizer.
2. Control soil or non-amended soil: soil with a mineral fertilizer.
3. Biosolid amended soil: soil with biosolid amendment as fertilizer.

The fertilizer-free soil was the natural soil, without any fertilizer. The non amended soil (control soil) was fertilized with a commercial fertilizer (N:P:K, 15:15:15; Fertiberia, Spain). The mineral fertilizer addition was equivalent to the waste application rates calculated to the amendment.

S1.3. Sample preparation

PFASs from wastes and soils (at the beginning $t=0$, and the end $t=\text{end}$ of the experiments) were extracted and purified according to the analytical procedure previously described (Navarro et al., 2011). Briefly, waste and soil (5 g for spinach and tomato experiments; 0.1 g for corn experiment) spiked with 5 μL of MPFAC-MXA, 0.5 μL of *N*-d₃-MeFOSA and 0.5 μL of *N*-d₅-EtFOSA were extracted with methanol in a PP tube, agitated at room temperature for 10 min, ultrasonicated at 40° C for 30 min and centrifuged for 15 min at 3000 rpm. The ultrasonication and centrifugation processes were repeated with fresh methanol. Extracts were combined and were passed through EnviCarb cartridges, diluted with Milli-Q water into 1 L and loaded in Oasis WAX. The purified extract was reduced to 140 μL under a gentle stream of nitrogen using TurboVap II evaporator (Vertex, Technics, Madrid, Spain). 240 μL of methanol and 240 μL of 2

mM ammonium acetate in Milli-Q water were added to the final extract spiked with 0.5 μL of $^{13}\text{C}_9$ -PFNA solution prior to HPLC-MS/MS injection. Spinach (whole plant, 1 g), tomato (1.5 g of root, 5 g of stem, 5 g of leaf and 4-8 g of ripe fruit), corn (0.01 g of root and 0.1-0.4 g of leaf) and earthworms (0.2 g) spiked with 5 μL of MPFAC-MXA, 0.5 μL of $N\text{-d}_3$ -MeFOSA and 0.5 μL of $N\text{-d}_5$ -EtFOSA were extracted with acetonitrile, vortex-mixed, shaken for 10 min, ultrasonicated at 40°C for 30 min and centrifuged for 15 min at 3000 rpm. The extraction process was repeated with fresh acetonitrile. Extracts were then combined and evaporated to 2 mL under nitrogen. 100 μL of acetic acid was added before centrifugation for 5 min at 2000 rpm and passed through EnviCarb SPE cartridges. The purified extract was then reduced according to the procedure previously described for waste and soils.

For HFR determination, samples were processed according to methods reported previously (De la Torre et al., 2011a; 2011b; 2012). Briefly, waste (0.5 g) and soil (2.5 g for spinach and tomato experiments; 0.1 g for corn experiment) samples spiked with 15 μL of MBDE-MXE, 2 μL of MDBDPE and 5 μL of MDP were extracted with a mixture of hexane:dichloromethane by pressurized fluid extraction (ASE 200, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Plant material (1 g for spinach; 1-15 g for tomato; 0.1-0.5 g for corn) samples were Soxhlet extracted with hexane/acetone (50:50, v/v) for 48 h and earthworms (0.1-0.4 g) with hexane/dichloromethane (50:50, v/v) for 24 h. The extracts were solvent exchanged with hexane and digested with 50 mL of concentrated sulphuric acid. Clean up was accomplished using a silica column (20 g silica: H_2SO_4 44% w/w, 2 g anhydrous sodium sulphate) and fractionation step was then performed in an automated purification Power Prep™ System (FMS Inc., USA) including acidic silica gel, basic alumina and carbon columns. Fractions were concentrated to dryness under a flow of nitrogen and redissolved in nonane and spiked with the ^{13}C injection standards solutions (4 μL of BDE-CVS-EISS) prior to GC-MS analyses.

S1.4. Instrumental analysis

PFASs were determined by HPLC-MS/MS (Varian 212 Liquid Chromatograph coupled to a Varian 320 triple quadrupole MS). The chromatographic separation was carried out in an ACE C18-PFP (50 x 2.1 mm, 3 μm) analytical column with 2 mM ammonium acetate in Milli-Q water (A) and methanol (B) mobile phase. The gradient started at 5% B at 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate, then was increased to 80% B in 5 min, changed to 100% B in 5 min and hold at that level for 5 min before reversion to original conditions at the 18 min time point.

PBDEs were analyzed by LRMS (Agilent 6890 Gas Chromatograph connected to an Agilent 5973 MSD) for wastes and soils but in the case of biotic samples (spinach, tomato, corn and earthworms) the sensitivity of the HRMS (Micromass Autospec Ultima) at 10,000 resolving power (10% valley) was needed. In both cases, electron ionization mode was used. The chromatographic separation was performed with short and narrow capillary column (15 m x 0.25 mm i.d. x 0.10 μm film thickness; DB5 MS from J&W Scientific, Folson CA). Pulsed splitless (30 psi) injections were performed on an injector at 280 °C. The initial oven temperature was set at 140 °C with a 1 min hold time, and ramped at 20 °C/min to 310 °C and held for 5 min. Transfer line and ion source were 280 and 230 °C, respectively. Helium at a constant flow (1 mL/min) was used as carrier gas.

Analysis of dechlorane compounds was conducted by ECNI-MS (Agilent 5973MSD) using methane as a reagent gas. The split-splitless injector was held constant at 265 °C. The initial oven temperature was set at 90 °C with a 1 min hold time, ramped at 20 °C/min to 300 °C and held for 3 min. Transfer line, source and quadrupole temperatures were set at 300, 150 and 150 °C, respectively.

Table S1.- Physicochemical characterization of the soil and biosolids used in tomato and spinach experiments.

Parameter	Soil	W1	W2
pH	7.50	7.84	8.76
EC (1:10) at 25 °C (dS/m)	1.90	2.23	2.8
Organic C (%)	3.0	33.21	11.55
NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	230	158	440
NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	9.7	3025	1214
N Kjeldahl (%)	0.11	5.86	1.19
Extractable K (%)	0.01	2.99	0.84
Extractable P (%)	0.11	0.36	0.85
Mg (%)	0.04	0.60	0.69
CaCO ₃ , equiv. (%)	<3	33.21	11.55
Ca (%)	0.24	4.32	14.13
Sand -0.05<D<2 mm- (%)	82.2	---	---
Silt -0.02<D<0.05 mm- (%)	3.8	---	---
Silt -0.002<D<0.02 mm- (%)	5.6	---	---
Clay -0.002 mm- (%)	8.4	---	---
Soil Type (USDA)	Loamy sand	---	---

Table S2.- Limits of detection (LODs) of PFASs (ng/g d.w.) and HFRs (pg/g d.w.).

	Waste	Soil	Spinach	Tomato				Corn		Earthworm
				Root	Stem	Leaf	Fruit	Root	Leaf	
PFBS	0.404	0.032	0.269	0.406	0.233	0.801	0.047	0.249	0.323	0.470
PFHxS	0.319	0.014	0.020	0.037	0.221	0.338	0.005	0.062	0.470	0.277
PFOS	0.006	0.027	0.143	0.006	0.012	0.102	0.014	0.133	0.020	0.014
PFDS	0.011	0.001	0.004	0.005	0.001	0.187	0.001	0.284	0.043	0.032
PFBA	0.902	0.024	0.833	0.859	0.077	0.604	0.134	0.823	0.837	0.486
PFPeA	0.190	0.054	0.380	0.176	0.041	0.211	0.029	0.045	0.236	0.361
PFHxA	0.150	0.047	0.353	0.466	0.234	0.358	0.042	0.210	0.485	0.315
PFHpA	0.092	0.024	0.345	0.215	0.067	0.649	0.024	0.220	0.201	0.459
PFOA	0.042	0.018	0.309	0.171	0.021	0.141	0.025	0.081	0.137	0.138
PFNA	0.001	0.011	0.338	0.109	0.012	0.020	0.009	0.259	0.351	0.049
PFDA	0.002	0.010	0.118	0.021	0.016	0.097	0.015	0.057	0.053	0.025
PFUdA	0.002	0.003	0.040	0.087	0.006	0.096	0.003	0.050	0.060	0.084
PFDoA	0.002	0.002	0.042	0.020	0.013	0.094	0.002	0.010	0.097	0.030
PFTTrDA	0.001	0.001	0.003	0.026	0.008	0.048	0.003	0.021	0.032	0.025
PFTeDA	0.002	0.001	0.009	0.012	0.004	0.065	0.001	0.079	0.050	0.049
PFHxDA	0.002	0.001	0.002	0.008	0.001	0.005	0.001	0.007	0.056	0.026
PFODA	0.003	0.004	0.002	0.003	0.003	0.002	0.001	0.006	0.015	0.054
FOSA	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.008	0.001	0.003
N-MeFOSA	0.001	0.012	0.003	0.001	0.002	0.047	0.001	0.031	0.017	0.006
N-EtFOSA	0.001	0.027	0.001	0.001	0.001	0.038	0.001	0.047	0.008	0.009

Limits of detection have been defined as the concentration giving a signal to noise ratio greater than 3.

Table S2.- Continued.

	Waste	Soil	Spinach	Tomato				Corn		Earthworm
				Root	Stem	Leaf	Fruit	Root	Leaf	
BDE-17	5.60	6.58	0.0023	0.0057	0.0063	0.0056	0.0086	0.0054	0.0063	0.0028
BDE-28	5.10	7.10	0.0044	0.0054	0.0075	0.0066	0.0059	0.0090	0.0064	0.0075
BDE-47	3.26	6.50	0.0054	0.0048	0.0070	0.0025	0.0066	0.0037	0.0049	0.0048
BDE-66	2.53	3.54	0.0036	0.0058	0.0036	0.0066	0.0027	0.0053	0.0056	0.0022
BDE-77	7.75	5.89	0.0062	0.0063	0.0079	0.0053	0.0094	0.0088	0.0064	0.0057
BDE-85	6.39	6.67	0.0081	0.0036	0.0076	0.0036	0.0076	0.0053	0.0062	0.0052
BDE-99	3.35	3.15	0.0066	0.0075	0.0085	0.0064	0.0070	0.0059	0.0075	0.0043
BDE-100	5.07	6.80	0.0032	0.0064	0.0037	0.0023	0.0062	0.0056	0.0385	0.0064
BDE-119	4.31	7.50	0.0064	0.0076	0.0055	0.0015	0.0039	0.0048	0.0029	0.0022
BDE-138	2.10	4.20	0.0088	0.0076	0.0063	0.0069	0.0054	0.0087	0.0057	0.0052
BDE-153	2.53	3.59	0.0063	0.0086	0.0048	0.0053	0.0046	0.0076	0.0073	0.0027
BDE-154	3.87	5.23	0.0053	0.0066	0.0083	0.0060	0.0069	0.0035	0.0066	0.0088
BDE-156	6.98	5.36	0.0012	0.0055	0.0023	0.0046	0.0037	0.0029	0.0062	0.0047
BDE-183	4.19	3.25	0.0076	0.0064	0.0064	0.0075	0.0086	0.0055	0.0056	0.0079
BDE-184	7.63	8.20	0.0087	0.0032	0.0071	0.0088	0.0868	0.0965	0.0093	0.0095
BDE-191	7.35	6.58	0.0045	0.0088	0.0063	0.0096	0.0075	0.0948	0.0044	0.0060
BDE-196	4.75	5.89	0.0024	0.0036	0.0012	0.0028	0.0073	0.0064	0.0022	0.0056
BDE-197	5.96	6.95	0.0015	0.0024	0.0035	0.0015	0.0016	0.0053	0.0030	0.0051
BDE-206	6.19	4.58	0.0037	0.0059	0.0046	0.0059	0.0074	0.0069	0.0076	0.0069
BDE-207	5.00	4.60	0.0057	0.0069	0.0074	0.0065	0.0086	0.0094	0.0053	0.0064
BDE-209	8.13	7.80	0.0064	0.0086	0.0095	0.0088	0.0098	0.0097	0.0087	0.0085
DBDPE	9.46	7.22	6.35	6.65	7.59	8.69	6.34	5.98	4.87	3.95
<i>syn</i> -DP	1.20	1.36	3.56	2.65	1.47	2.39	5.60	2.74	7.29	4.58
<i>anti</i> -DP	1.00	1.56	2.69	3.04	3.60	1.84	2.68	5.05	1.56	3.65
Dec 602	7.56	6.58	8.60	5.69	7.53	5.69	5.81	6.52	6.92	7.54
Dec 603	5.69	7.82	6.93	8.27	6.98	6.78	7.56	3.78	9.58	6.58
Dec 604	4.70	3.56	5.38	9.38	4.68	5.91	6.95	9.82	4.63	6.89
CP	5.68	6.89	4.17	6.90	6.92	7.80	8.70	4.58	5.89	7.58
Mirex	9.50	8.70	7.87	5.76	5.20	7.50	6.98	9.23	9.60	8.52

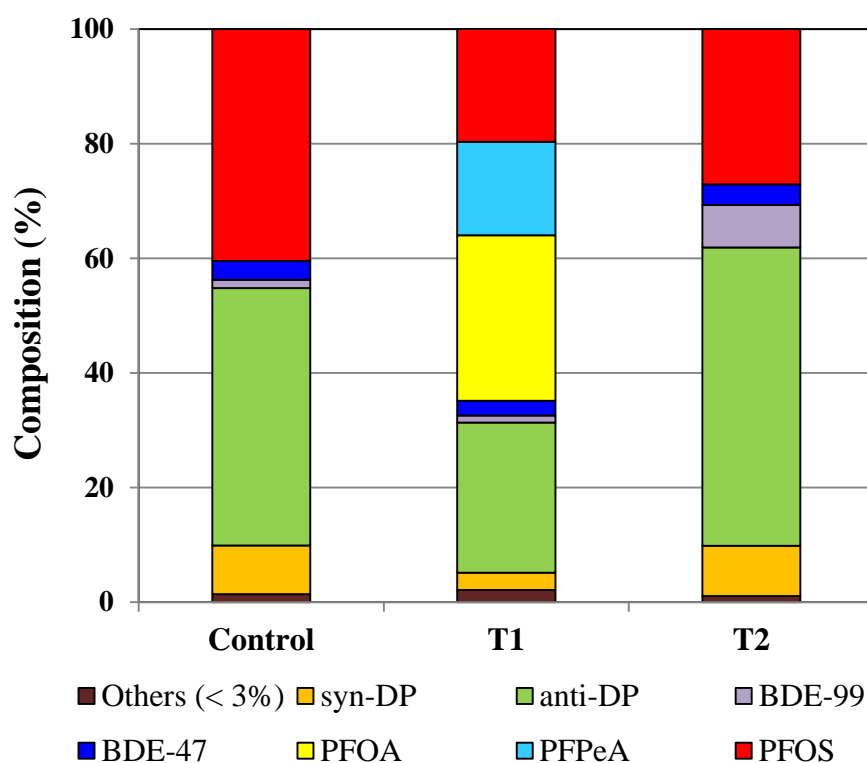


Fig. S1.- Percentage distribution profiles (%) of the PFASs, PBDE congeners and DP detected in the spinach plants. For clarity, only compounds with contribution higher than 3% are shown; those with <3% are included as *others* (BDE-17, BDE-28, BDE-77, BDE-100, BDE-153, BDE-154, BDE-183).

Table S3.- Detail of the individual compound percentage distribution (%) in the spinach plants.

	Control	Treatment-1	Treatment-2
PFOS	40.5 %	19.7 %	27.1 %
PFPeA	---	16.3 %	---
PFOA	---	28.9 %	---
BDE-17	---	0.1 %	0.3 %
BDE-28	---	0.1 %	---
BDE-47	3.3 %	2.6 %	3.6 %
BDE-77	---	0.1 %	---
BDE-99	1.4 %	1.2 %	7.4 %
BDE-100	0.2 %	0.2 %	---
BDE-153	1.2 %	0.5 %	0.3 %
BDE-154	---	0.2 %	0.5 %
BDE-183	---	0.9 %	---
<i>anti-DP</i>	44.9 %	26.2 %	52.1 %
<i>syn-DP</i>	8.5 %	3.0 %	8.8 %

Table S4.- Transfer factors (TFs) for the different compounds in the spinach experiment.

	Control	Treatment-1	Treatment-2
PFOS	6.00	3.82	4.47
PFPeA	---	1.08	---
PFOA	---	1.63	---
BDE-17	---	3.08	2.28
BDE-47	1.62	2.12	1.02
BDE-99	0.27	0.45	0.93
BDE-100	0.26	0.45	---
BDE-153	0.51	0.38	0.06
BDE-154	---	0.24	0.22
BDE-183	---	0.37	---
<i>anti-DP</i>	16.43	28.29	19.06
<i>syn-DP</i>	5.07	6.71	7.06

Transfer factors were calculated by division of the amount found in the plant tissue on a dry weight basis (ng/g d.w.) by the concentration determined in the soil on a dry weight basis (ng/g d.w.).

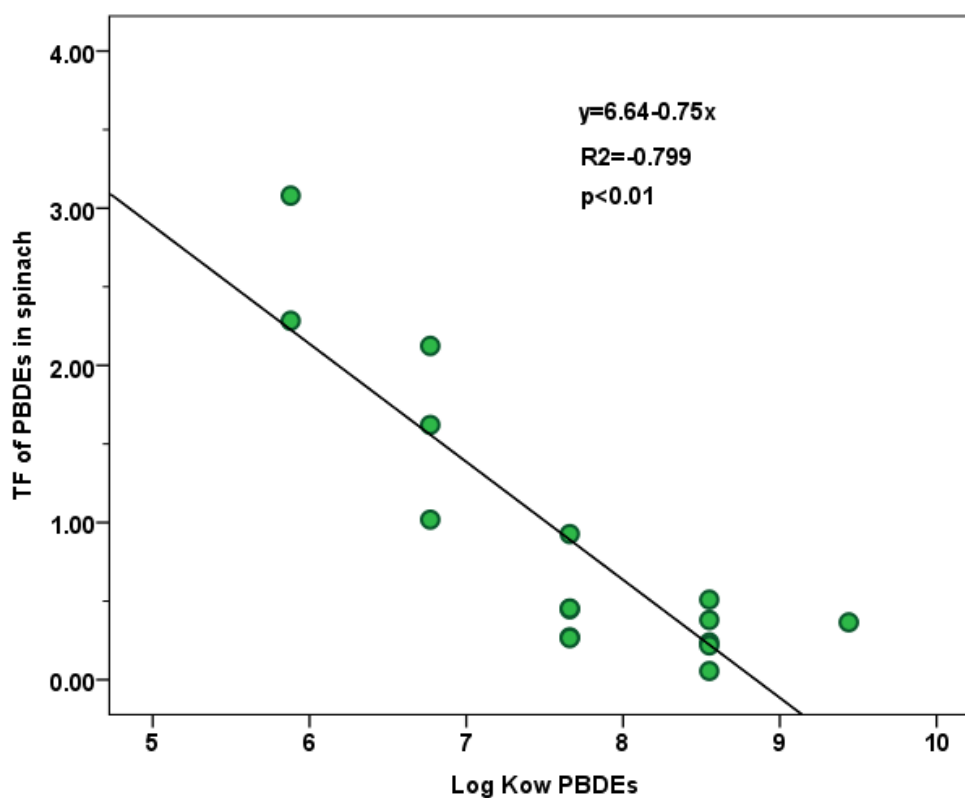
**Fig. S2.-** Relationship between transfer factor in spinach and log K_{ow} for PBDEs. Log K_{ow} used were calculated by EPISuite 4.1 (see Table S6).

Table S5.- Concentrations of PFASs and HFRs (ng/g w.w.) in spinach plant.

	Control		Treatment-1	Treatment-2
	Seedbed spinach	Spinach	Spinach	Spinach
PFOS	N.D.	0.110	0.082	0.042
PFPeA	N.D.	N.D.	0.068	N.D.
PFOA	N.D.	N.D.	0.120	N.D.
Σ PFASs	N.D.	0.110	0.270	0.042
BDE-17	N.D.	N.D.	0.001	0.001
BDE-28	N.D.	N.D.	0.001	N.D.
BDE-47	N.D.	0.016	0.020	0.019
BDE-99	N.D.	0.006	0.010	0.038
BDE-100	N.D.	0.001	0.002	N.D.
BDE-153	N.D.	0.006	0.004	0.001
BDE-154	N.D.	N.D.	0.002	0.002
BDE-183	N.D.	N.D.	0.006	N.D.
Σ PBDEs	N.D.	0.029	0.045	0.061
<i>anti</i>-DP	N.D.	0.210	0.204	0.267
<i>syn</i>-DP	N.D.	0.040	0.024	0.045
Σ DP	N.D.	0.250	0.228	0.312
<i>f_{syn}</i>	---	0.159	0.105	0.143

N.D.: not detected

PFBS, PFHxS, PFDS, PFBA, PFHxA, PFHpA, PFNA, PFDA, PFUdA, PFDaA, PFTTrDA, PFTeDA, PFHxDA, PFODA, FOSA, N-MeFOSA, N-EtFOSA, BDE-66, -77, -85, -119, -138, -156, -184, -191, -196, -197, -206, -207, -209, DBDPE, Dec 602, Dec 603, Dec 604, CP and Mirex were not detected in any sample.

Table S6.- Log K_{ow} calculated by EPISuite 4.1 and comparison with various hydrophobicity parameters.

	Log K _{ow} (EPISuite 4.1)	Log K _{ow} (Arp et al., 2006)	Log K _{ow} (Kelly et al., 2009)	Log K _{ow} (Wang et al., 2011)	Log K ₀ (De Voogt et al., 2012)
PFBS	1.82	---	---	3.90	2.32
PFHxS	3.16	---	---	5.17	3.63
PFOS	4.49	5.26	4.30	6.43	5.02
PFBA	2.14	---	---	2.82	1.83
PFPeA	2.81	---	---	---	---
PFHxA	3.48	3.12	---	3.42	2.88
PFHpA	4.15	3.83	2.80	4.06	3.44
PFOA	4.81	4.59	3.60	4.67	4.22
PFNA	5.48	5.45	4.50	5.30	4.93
PFDA	6.15	6.38	5.40	6.50	5.73
PFUdA	6.82	7.40	6.40	7.15	6.22
PFDaA	7.49	---	7.10	7.77	7.02
PFTTrDA	8.16	---	---	---	---
PFTeDA	8.83	---	---	---	---
FOSA	5.80	---	---	---	5.81

	Log K _{ow} (EPISuite 4.1)	Log K _{ow} (Alcock et al., 1999)	Log K _{ow} (Wania and Dugani, 2003)	Log K _{ow} (Braekevelt et al., 2003)
BDE-17	5.88	5.47 - 5.58	---	5.74
BDE-28	5.88	5.47 - 5.58	---	5.94
BDE-47	6.77	5.87 - 6.16	---	6.81
BDE-66	6.77	5.87 - 6.16	---	---
BDE-77	6.77	5.87 - 6.16	---	---
BDE-85	7.66	6.64 - 6.97	---	7.37
BDE-99	7.66	6.64 - 6.97	---	7.32
BDE-100	7.66	6.64 - 6.97	---	7.24
BDE-119	7.66	6.64 - 6.97	---	---
BDE-138	8.55	6.86 - 7.92	---	---
BDE-153	8.55	6.86 - 7.92	---	7.90
BDE-154	8.55	6.86 - 7.92	---	7.82
BDE-156	8.55	6.86 - 7.92	---	---
BDE-183	9.44	---	7.49	8.27
BDE-184	9.44	---	7.49	---
BDE-191	9.44	---	7.49	---
BDE-196	10.33	5.50 - 8.90	7.90	---
BDE-197	10.33	5.50 - 8.90	7.90	---
BDE-206	11.22	---	8.30	---
BDE-207	11.22	---	8.30	---
BDE-209	12.11	> 5.00	8.70	---
DBDPE	13.64	---	---	---
DP	11.27	---	---	9.30

Log K_{ow} values were calculated using EPISuite 4.1 software for facilitating the comparison between the different compounds studied. Data obtained correspond well with log K_{ow} values previously reported in the literature.

Table S7.- Concentrations (mean \pm SD) of PFASs and HFRs (ng/g d.w.) in wastes, soils and different compartments of tomato plants.

	Waste	Soil $t=0$	Soil $t=final$	Root	Stem	Leaf	Fruit
PFBS							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.D.
Control	---	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 2	2.05 \pm 0.36	0.13 \pm 0.03	0.20 \pm 0.09	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFOS							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.D.
Control	---	0.28 \pm 0.07	0.20 \pm 0.04	1.10 \pm 0.35	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 1	28.20 \pm 2.19	0.47 \pm 0.10	0.57 \pm 0.12	1.17 \pm 0.84	0.24 \pm 0.10	0.65 \pm 0.39	0.03 \pm 0.05
Treatment - 2	0.65 \pm 0.30	0.30 \pm 0.03	0.30 \pm 0.02	0.44 \pm 0.40	0.02 \pm 0.04	0.11 \pm 0.27	N.D.
PFBA							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	1.78	N.D.	N.D.
Control	---	0.03 \pm 0.04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.38 \pm 0.20
Treatment - 1	34.25 \pm 10.22	0.74 \pm 0.20	0.06 \pm 0.04	N.D.	6.19 \pm 1.04	38.07 \pm 24.37	12.45 \pm 2.55
Treatment - 2	5.74 \pm 0.89	0.07 \pm 0.04	N.D.	N.D.	0.78 \pm 0.85	N.D.	2.48 \pm 0.99
PFPeA							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.D.
Control	---	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.07 \pm 1.86
Treatment - 1	2.11 \pm 0.11	1.90 \pm 0.33	0.79 \pm 0.03	8.24 \pm 3.07	15.72 \pm 2.60	37.49 \pm 18.62	42.05 \pm 5.87
Treatment - 2	2.29 \pm 0.41	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.80 \pm 0.53
PFHxA							
Fertilizer-free plant	---	0.09	---	N.A.	N.D.	35.63	N.D.
Control	---	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.23 \pm 0.25
Treatment - 1	4.77 \pm 0.37	1.66 \pm 0.38	1.86 \pm 0.35	1.75 \pm 2.29	3.11 \pm 0.83	12.14 \pm 4.24	6.39 \pm 1.40
Treatment - 2	1.78 \pm 0.32	N.D.	0.08 \pm 0.07	N.D.	N.D.	N.D.	0.19 \pm 0.20
PFHpA							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.D.
Control	---	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 1	0.85 \pm 0.14	N.D.	0.37 \pm 0.01	0.99 \pm 0.87	N.D.	N.D.	0.17 \pm 0.07
Treatment - 2	0.80 \pm 0.04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFOA							
Fertilizer-free plant	---	0.19	---	N.A.	N.D.	0.34	N.D.
Control	---	0.20 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.45 \pm 0.15	0.06 \pm 0.10	0.65 \pm 0.19	N.D.
Treatment - 1	8.90 \pm 0.13	1.20 \pm 0.24	3.36 \pm 0.46	9.96 \pm 9.01	1.26 \pm 0.41	8.10 \pm 2.16	0.18 \pm 0.01
Treatment - 2	2.52 \pm 0.24	0.24 \pm 0.05	0.23 \pm 0.07	0.37 \pm 0.12	0.08 \pm 0.08	0.99 \pm 0.13	N.D.
PFNA							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.D.
Control	---	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 1	2.58 \pm 1.03	0.14 \pm 0.02	0.21 \pm 0.01	0.78 \pm 0.77	N.D.	0.05 \pm 0.08	N.D.
Treatment - 2	0.73 \pm 0.21	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFDA							
Fertilizer-free plant	---	0.02	---	N.A.	N.D.	N.D.	0.03
Control	---	0.08 \pm 0.03	0.05 \pm 0.02	0.12 \pm 0.11	N.D.	N.D.	0.02 \pm 0.02
Treatment - 1	19.00 \pm 0.61	1.30 \pm 0.25	1.55 \pm 0.16	3.85 \pm 2.66	0.34 \pm 0.07	N.D.	0.03 \pm 0.03
Treatment - 2	0.64 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.03 \pm 0.04	N.D.	N.D.	N.D.
PFUdA							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.D.
Control	---	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 1	2.57 \pm 0.37	0.13 \pm 0.03	0.15 \pm 0.03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 2	0.17 \pm 0.05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PFDoA							
Fertilizer-free plant	---	0.13	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.D.
Control	---	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 1	2.20 \pm 0.53	0.27 \pm 0.08	0.24 \pm 0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 2	0.17 \pm 0.08	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Σ PFASs							
Fertilizer-free plant	---	0.43	---	N.A.	1.78	35.97	0.03
Control	---	0.58 \pm 0.19	0.40 \pm 0.02	1.67 \pm 0.36	0.06 \pm 0.86	0.64 \pm 0.19	2.74 \pm 2.23
Treatment - 1	105.43 \pm 8.34	7.82 \pm 1.60	9.17 \pm 0.90	26.75 \pm 15.88	26.84 \pm 4.17	96.50 \pm 41.35	61.30 \pm 8.04
Treatment - 2	17.54 \pm 1.11	0.88 \pm 0.02	0.92 \pm 0.21	0.83 \pm 0.55	0.89 \pm 0.85	1.10 \pm 0.24	3.47 \pm 1.55

Table S7.- Continued.

	Waste	Soil $t=0$	Soil $t=final$	Root	Stem	Leaf	Fruit
BDE-17							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	0.01	N.D.	N.A.
Control	---	0.01 ± 0.01	N.D.	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Treatment - 1	0.09 ± 0.02	0.01 ± 0.03	N.D.	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Treatment - 2	0.05 ± 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
BDE-28							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.01 ± 0.01	N.D.	0.04 ± 0.01	N.D.	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Treatment - 1	0.22 ± 0.01	0.01 ± 0.02	N.D.	0.01 ± 0.02	N.D.	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02
Treatment - 2	0.30 ± 0.03	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	N.D.	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01
BDE-47							
Fertilizer-free plant	---	0.10	---	N.A.	N.D.	0.03	N.A.
Control	---	0.18 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.36 ± 0.06	N.D.	0.31 ± 0.02	0.34 ± 0.27
Treatment - 1	7.19 ± 0.31	0.29 ± 0.08	0.17 ± 0.02	0.28 ± 0.25	N.D.	0.32 ± 0.02	0.43 ± 0.06
Treatment - 2	3.44 ± 0.51	0.22 ± 0.10	0.23 ± 0.03	0.27 ± 0.25	N.D.	0.37 ± 0.04	0.49 ± 0.28
BDE-66							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 1	0.24 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 2	0.28 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BDE-99							
Fertilizer-free plant	---	0.14	---	N.A.	N.D.	0.02	N.A.
Control	---	0.24 ± 0.05	0.22 ± 0.15	0.37 ± 0.13	N.D.	0.15 ± 0.01	0.06 ± 0.05
Treatment - 1	12.42 ± 0.25	0.38 ± 0.11	0.23 ± 0.05	0.51 ± 0.57	N.D.	0.17 ± 0.01	0.06 ± 0.05
Treatment - 2	7.87 ± 0.52	0.42 ± 0.21	0.54 ± 0.24	0.55 ± 0.50	N.D.	0.11 ± 0.10	0.12 ± 0.04
BDE-100							
Fertilizer-free plant	---	0.03	---	N.A.	N.D.	0.01	N.A.
Control	---	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.21	N.D.	0.06 ± 0.05	0.02 ± 0.02
Treatment - 1	2.36 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.04	N.D.	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.03
Treatment - 2	1.36 ± 0.07	0.06 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.05	N.D.	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.01
BDE-153							
Fertilizer-free plant	---	0.06	---	N.A.	0.01	0.01	N.A.
Control	---	0.06 ± 0.05	0.08 ± 0.03	0.04 ± 0.01	N.D.	0.01 ± 0.01	N.D.
Treatment - 1	1.55 ± 0.21	0.14 ± 0.04	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.01	N.D.	0.01 ± 0.01	N.D.
Treatment - 2	1.61 ± 0.14	0.10 ± 0.04	0.10 ± 0.03	N.D.	N.D.	0.01 ± 0.01	N.D.
BDE-154							
Fertilizer-free plant	---	0.33	---	N.A.	0.01	0.01	N.A.
Control	---	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	N.D.	0.01 ± 0.01	N.D.
Treatment - 1	1.01 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.01 ± 0.01	N.D.	0.01 ± 0.01	N.D.
Treatment - 2	0.73 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.01	N.D.	N.D.	0.01 ± 0.01	0.11 ± 0.19
BDE-183							
Fertilizer-free plant	---	0.09	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.17 ± 0.04	0.17 ± 0.06	0.07 ± 0.03	0.01 ± 0.01	N.D.	N.D.
Treatment - 1	1.91 ± 0.03	0.23 ± 0.11	0.14 ± 0.03	0.06 ± 0.11	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 2	3.29 ± 0.21	0.24 ± 0.09	0.28 ± 0.13	N.D.	N.D.	N.D.	0.02 ± 0.03
BDE-184							
Fertilizer-free plant	---	0.02	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 1	N.D.	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 2	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BDE-191							
Fertilizer-free plant	---	0.04	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.07 ± 0.03	0.03 ± 0.03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 1	N.D.	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment - 2	0.21 ± 0.18	N.D.	0.02 ± 0.04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Table S7.- Continued.

	Waste	Soil $t=0$	Soil $t=final$	Root	Stem	Leaf	Fruit
BDE-196							
Fertilizer-free plant	---	0.36	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.28 ± 0.12	0.20 ± 0.15	0.03 ± 0.03	N.D.	0.02 ± 0.02	N.D.
Treatment - 1	1.96 ± 0.41	0.52 ± 0.09	0.25 ± 0.06	N.D.	N.D.	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.02
Treatment - 2	1.75 ± 0.13	0.26 ± 0.07	0.24 ± 0.09	N.D.	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	N.D.
BDE-197							
Fertilizer-free plant	---	0.17	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.25 ± 0.06	0.12 ± 0.12	0.03 ± 0.02	N.D.	0.02 ± 0.01	N.D.
Treatment - 1	0.90 ± 0.08	0.32 ± 0.11	0.19 ± 0.01	N.D.	N.D.	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Treatment - 2	2.18 ± 0.58	0.19 ± 0.09	0.31 ± 0.08	N.D.	N.D.	0.02 ± 0.02	N.D.
BDE-206							
Fertilizer-free plant	---	0.27	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.43 ± 0.16	0.72 ± 0.39	0.13 ± 0.04	N.D.	0.13 ± 0.16	0.01 ± 0.01
Treatment - 1	14.78 ± 1.21	0.62 ± 0.14	0.57 ± 0.17	N.D.	N.D.	0.32 ± 0.29	0.47 ± 0.27
Treatment - 2	5.79 ± 0.98	0.52 ± 0.09	0.89 ± 0.25	N.D.	N.D.	0.06 ± 0.08	0.58 ± 0.14
BDE-207							
Fertilizer-free plant	---	0.37	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.47 ± 0.07	0.60 ± 0.43	0.16 ± 0.08	N.D.	0.11 ± 0.09	0.01 ± 0.01
Treatment - 1	10.38 ± 0.44	0.76 ± 0.21	0.67 ± 0.21	N.D.	N.D.	0.21 ± 0.19	0.43 ± 0.22
Treatment - 2	8.60 ± 0.46	0.82 ± 0.24	1.05 ± 0.35	N.D.	N.D.	0.07 ± 0.06	0.50 ± 0.103
BDE-209							
Fertilizer-free plant	---	1.91	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	3.07 ± 0.51	10.52 ± 1.89	2.92 ± 0.81	N.D.	4.75 ± 3.95	0.10 ± 0.17
Treatment - 1	277.80 ± 21.00	6.87 ± 1.01	6.54 ± 1.85	N.D.	N.D.	10.44 ± 11.49	9.31 ± 6.17
Treatment - 2	129.99 ± 8.68	7.9 ± 1.09	6.64 ± 1.22	N.D.	N.D.	3.87 ± 2.68	9.39 ± 1.09
Σ PBDEs							
Fertilizer-free plant	---	3.89	---	N.A.	0.01	0.07	N.A.
Control	---	5.38 ± 1.01	12.95 ± 1.38	4.26 ± 1.00	0.003 ± 0.001	5.56 ± 4.22	0.55 ± 0.17
Treatment - 1	333.33 ± 21.22	10.47 ± 0.62	8.99 ± 2.44	0.92 ± 0.85	0.002 ± 0.001	11.57 ± 12.03	10.77 ± 6.61
Treatment - 2	167.98 ± 9.37	10.88 ± 0.93	10.49 ± 0.65	0.88 ± 0.81	0.01 ± 0.01	3.28 ± 2.87	11.27 ± 0.89
DBDPE							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	N.D.	N.D.	N.D.	0.57 ± 0.50	1.72 ± 1.37	N.D.
Treatment - 1	125.83 ± 0.02	6.35 ± 1.13	2.28 ± 1.87	0.11 ± 0.20	N.D.	3.58 ± 1.17	N.D.
Treatment - 2	149.46 ± 0.01	26.5 ± 4.01	25.61 ± 5.28	0.23 ± 0.39	1.30 ± 0.53	0.82 ± 0.71	N.D.
anti-DP							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.17 ± 0.17	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.04
Treatment - 1	10.68 ± 1.31	0.17 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.18	0.03 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.14 ± 0.16
Treatment - 2	4.10 ± 0.11	0.12 ± 0.04	0.15 ± 0.02	0.04 ± 0.07	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.03
syn-DP							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Treatment - 1	3.89 ± 0.22	0.07 ± 0.04	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Treatment - 2	1.35 ± 0.06	0.06 ± 0.02	0.09 ± 0.04	0.01 ± 0.02	N.D.	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Σ DP							
Fertilizer-free plant	---	N.D.	---	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Control	---	0.13 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.28 ± 0.09	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.04
Treatment - 1	14.57 ± 1.43	0.24 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.23 ± 0.22	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.15 ± 0.16
Treatment - 2	5.45 ± 0.14	0.18 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.05 ± 0.09	0.03 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.03
f_{syn}							
Fertilizer-free plant	---	---	---	N.A.	---	---	N.A.
Control	---	0.26 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.10 ± 0.08	0.25 ± 0.16	0.04 ± 0.03	0.09 ± 0.06
Treatment - 1	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.25 ± 0.06	0.12 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.08	0.09 ± 0.09
Treatment - 2	0.25 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.36 ± 0.08	0.23 ± 0.01	---	0.22 ± 0.07	0.16 ± 0.05

Mean ± SD (n=3); N.D.: not detected; N.A.: not available

PFHxS, PFDS, PFT rDA, PFT eDA, PFHxDA, PFODA, FOSA, N-MeFOSA, N-EtFOSA, BDE-77, -85, -119, -138, -156, Dec 602, Dec 603, Dec 604, CP and Mirex were not detected in any sample.

Table S8.- Concentrations of PFASs and HFRs (ng/g w.w.) in tomato fruit.

	Control	Treatment-1	Treatment-2
PFOS	N.D.	0.003 ± 0.004	N.D.
PFBA	0.094 ± 0.025	0.946 ± 0.207	0.171 ± 0.064
PFPeA	0.084 ± 0.146	3.210 ± 0.605	0.057 ± 0.040
PFHxA	0.017 ± 0.020	0.498 ± 0.164	0.015 ± 0.015
PFHpA	N.D.	0.012 ± 0.003	N.D.
PFOA	N.D.	0.014 ± 0.003	N.D.
PFDA	N.D.	0.002 ± 0.002	N.D.
Σ PFASs	0.195 ± 0.042	4.685 ± 0.988	0.242 ± 0.119
BDE-17	0.0001 ± 0.0001	0.001 ± 0.001	0.0003 ± 0.0002
BDE-28	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.002	0.002 ± 0.0004
BDE-47	0.024 ± 0.021	0.033 ± 0.009	0.036 ± 0.025
BDE-99	0.004 ± 0.003	0.005 ± 0.004	0.008 ± 0.004
BDE-100	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.002	0.002 ± 0.001
BDE-154	N.D.	N.D.	0.006 ± 0.011
BDE-183	N.D.	N.D.	0.001 ± 0.002
BDE-196	N.D.	0.001 ± 0.001	N.D.
BDE-197	N.D.	0.001 ± 0.001	N.D.
BDE-206	0.0003 ± 0.001	0.034 ± 0.016	0.040 ± 0.009
BDE-207	0.0004 ± 0.001	0.032 ± 0.011	0.034 ± 0.002
BDE-209	0.007 ± 0.012	0.671 ± 0.347	0.671 ± 0.173
Σ PBDEs	0.038 ± 0.008	0.780 ± 0.209	0.803 ± 0.208
anti-DP	0.004 ± 0.002	0.010 ± 0.010	0.006 ± 0.003
syn-DP	0.0003 ± 0.0005	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001
Σ DP	0.005 ± 0.002	0.011 ± 0.006	0.007 ± 0.003
<i>f_{syn}</i>	0.089 ± 0.059	0.093 ± 0.095	0.163 ± 0.051

N.D.: not detected

PFBS, PFHxS, PFDS, PFNA, PFUdA, PFDoA, PFTTrDA, PFTeDA, PFHxDA, PFODA, FOSA, N-MeFOSA, N-EtFOSA, BDE-66, -77, -85, -119, -138, -153, -156, -184, -191, DBDPE, Dec 602, Dec 603, Dec 604, CP and Mirex were not detected in any sample.

Table S9.- Transfer factors (mean \pm SD) of PFASs and HFRs in the different tomato plant tissues.

	Control				Treatment-1				Treatment-2			
	Root	Stem	Leaf	Fruit	Root	Stem	Leaf	Fruit	Root	Stem	Leaf	Fruit
PFOS	4.53 \pm 1.45	---	---	---	2.25 \pm 1.61	0.45 \pm 0.18	1.24 \pm 0.74	0.06 \pm 0.10	1.44 \pm 1.32	0.05 \pm 0.13	0.36 \pm 0.89	---
PFBA	---	---	---	53.80 \pm 7.97	---	15.35 \pm 2.57	94.41 \pm 60.44	30.87 \pm 6.33	---	21.88 \pm 24.00	---	69.82 \pm 28.01
PFPeA	---	---	---	---	6.12 \pm 2.28	11.67 \pm 1.93	27.84 \pm 13.82	31.22 \pm 4.36	---	---	---	---
PFHxA	---	---	---	---	1.00 \pm 1.31	1.77 \pm 0.47	6.91 \pm 2.41	3.64 \pm 0.80	---	---	---	5.06 \pm 5.30
PFHpA	---	---	---	---	5.33 \pm 4.67	---	---	0.91 \pm 0.36	---	---	---	---
PFOA	2.62 \pm 0.87	0.34 \pm 0.59	1.82 \pm 2.82	---	4.37 \pm 3.95	0.55 \pm 0.18	3.55 \pm 0.95	0.08 \pm 0.01	1.54 \pm 0.49	0.35 \pm 0.32	4.14 \pm 0.56	---
PFNA	---	---	---	---	4.53 \pm 4.47	---	0.28 \pm 0.48	---	---	---	---	---
PFDA	1.76 \pm 1.61	---	---	0.75 \pm 0.53	2.70 \pm 1.86	0.24 \pm 0.05	---	0.02 \pm 0.02	0.22 \pm 0.38	0.10 \pm 0.25	---	0.02 \pm 0.03
BDE-17	8.00 \pm 1.20	0.84 \pm 0.30	1.21 \pm 0.16	0.66 \pm 0.68	3.00 \pm 0.01	0.53 \pm 0.03	0.49 \pm 0.19	2.36 \pm 2.34	---	---	---	---
BDE-28	33.27 \pm 11.25	---	9.26 \pm 1.07	16.68 \pm 12.42	9.43 \pm 0.01	---	3.30 \pm 0.37	7.54 \pm 6.29	3.21 \pm 0.11	---	1.94 \pm 0.61	5.44 \pm 1.29
BDE-47	2.64 \pm 0.46	---	2.28 \pm 0.14	2.48 \pm 1.99	2.11 \pm 0.50	---	1.60 \pm 0.13	2.15 \pm 0.30	1.77 \pm 0.59	---	1.64 \pm 0.16	2.17 \pm 1.23
BDE-66	3.20 \pm 0.18	---	---	---	---	0.03 \pm 0.01	---	---	---	0.12 \pm 0.01	---	---
BDE-99	1.58 \pm 0.55	---	0.66 \pm 0.06	0.27 \pm 0.21	2.93 \pm 1.91	---	0.63 \pm 0.04	0.35 \pm 0.07	1.61 \pm 0.44	---	0.33 \pm 0.03	0.23 \pm 0.09
BDE-100	1.31 \pm 0.42	---	1.14 \pm 0.91	0.39 \pm 0.30	0.97 \pm 0.12	---	0.59 \pm 0.04	0.65 \pm 0.03	0.98 \pm 0.32	---	0.53 \pm 0.08	0.47 \pm 0.14
BDE-153	0.52 \pm 0.11	---	0.08 \pm 0.03	---	0.28 \pm 0.01	---	0.07 \pm 0.01	---	---	---	0.10 \pm 0.01	---
BDE-154	0.59 \pm 0.20	0.01 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	---	0.22 \pm 0.01	---	0.06 \pm 0.01	---	---	0.01 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	4.47 \pm 0.01
BDE-183	0.39 \pm 0.19	0.02 \pm 0.01	---	---	1.16 \pm 0.01	---	---	---	---	---	---	0.21 \pm 0.01
BDE-184	0.21 \pm 0.01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BDE-196	0.22 \pm 0.01	---	0.13 \pm 0.01	---	---	---	0.12 \pm 0.03	0.11 \pm 0.01	---	0.03 \pm 0.01	0.16 \pm 0.03	---
BDE-197	0.19 \pm 0.05	---	0.09 \pm 0.02	---	---	---	0.10 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	---	---	0.11 \pm 0.05	---
BDE-206	0.20 \pm 0.06	---	0.30 \pm 0.26	0.02 \pm 0.01	---	---	0.55 \pm 0.50	0.80 \pm 0.46	---	---	0.11 \pm 0.10	0.72 \pm 0.18
BDE-207	0.27 \pm 0.13	---	0.19 \pm 0.16	0.03 \pm 0.01	---	---	0.30 \pm 0.27	0.62 \pm 0.31	---	---	0.11 \pm 0.01	0.50 \pm 0.10
BDE-209	0.34 \pm 0.09	---	0.55 \pm 0.46	0.03 \pm 0.01	---	---	1.58 \pm 1.79	1.41 \pm 0.93	---	---	0.56 \pm 0.39	1.35 \pm 0.16
DBDPE	---	---	---	---	0.10 \pm 0.01	---	1.08 \pm 0.36	---	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	---
<i>anti</i> -DP	3.93 \pm 1.53	0.63 \pm 0.12	1.05 \pm 0.42	1.01 \pm 0.53	1.60 \pm 1.47	0.30 \pm 0.05	0.48 \pm 0.21	1.10 \pm 1.21	0.83 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02	0.64 \pm 0.10	0.55 \pm 0.18
<i>syn</i> -DP	0.90 \pm 0.49	0.53 \pm 0.37	0.12 \pm 0.11	0.31 \pm 0.35	0.99 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01	0.28 \pm 0.12	0.25 \pm 0.21	0.42 \pm 0.01	---	0.31 \pm 0.11	---

Transfer factors were calculated by dividing the compound concentration in the different tomato plant tissues by the concentration in the soil (both on a dry weight basis).

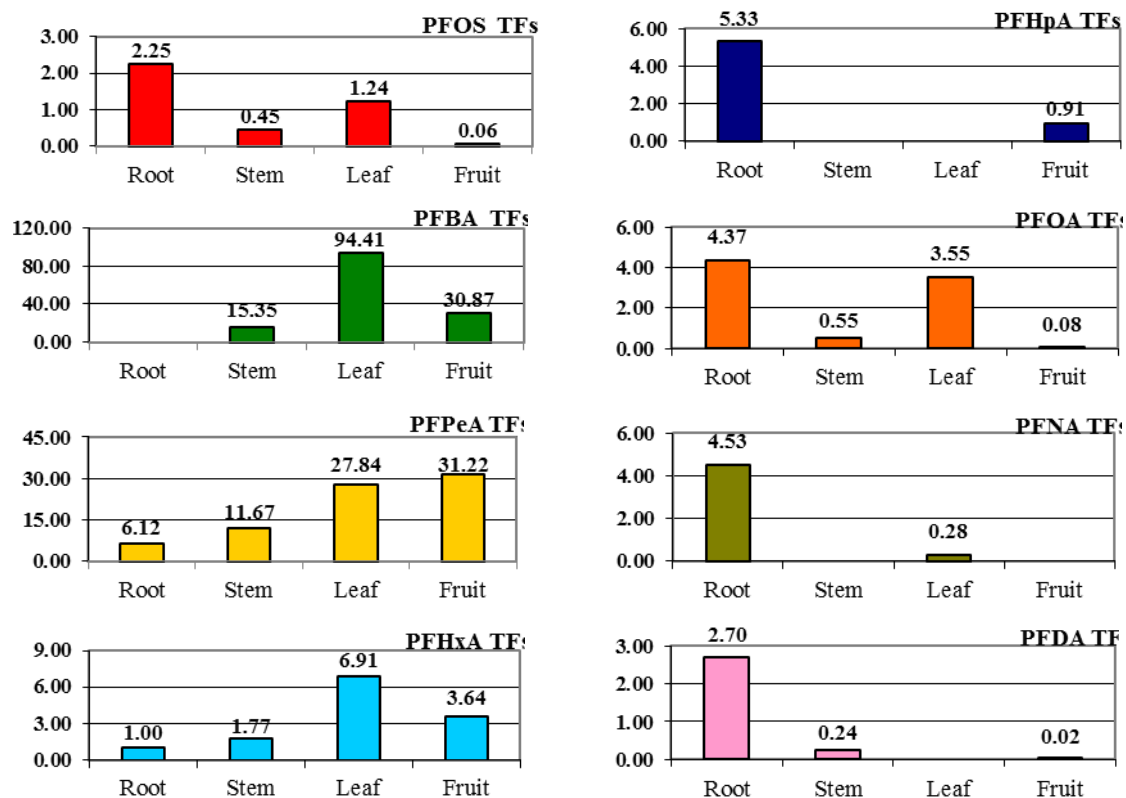


Fig. S3.- Transfer factors (mean obtained for T2) of PFASs in the different tomato plant tissues.

Table S10.- Transfer factors (mean \pm SD) between tomato plant parts: LCF and ECF.

	Control		Treatment-1		Treatment-2	
	LCF	ECF	LCF	ECF	LCF	ECF
PFOS	---	---	0.55 \pm 0.33	0.05 \pm 0.08	0.25 \pm 0.62	---
PFBA	---	---	---	0.33 \pm 0.07	---	---
PFPeA	---	---	4.55 \pm 2.26	1.12 \pm 0.16	---	---
PFHxA	---	---	6.92 \pm 2.42	0.53 \pm 0.12	---	---
PFOA	1.44 \pm 0.43	---	0.81 \pm 0.22	0.02 \pm 0.01	2.69 \pm 0.36	---
PFNA	---	---	0.06 \pm 0.11	---	---	---
BDE-17	0.15 \pm 0.02	0.54 \pm 0.57	0.16 \pm 0.06	4.81 \pm 4.77	---	1.25 \pm 0.56
BDE-28	0.28 \pm 0.03	1.80 \pm 1.34	0.35 \pm 0.04	2.29 \pm 1.91	0.60 \pm 0.19	2.80 \pm 0.66
BDE-47	0.86 \pm 0.05	1.09 \pm 0.87	0.76 \pm 0.06	1.35 \pm 0.19	0.92 \pm 0.09	1.33 \pm 0.75
BDE-99	0.42 \pm 0.04	0.40 \pm 0.32	0.22 \pm 0.01	0.55 \pm 0.11	0.20 \pm 0.02	0.70 \pm 0.27
BDE-100	0.87 \pm 0.69	0.34 \pm 0.27	0.61 \pm 0.04	1.12 \pm 0.06	0.54 \pm 0.08	0.88 \pm 0.26
BDE-153	0.16 \pm 0.05	---	0.24 \pm 0.05	---	---	---
BDE-154	0.14 \pm 0.04	---	0.27 \pm 0.04	---	---	59.84 \pm 0.01
BDE-196	0.59 \pm 0.01	---	---	0.90 \pm 0.01	---	---
BDE-197	0.48 \pm 0.12	---	---	1.04 \pm 0.01	---	---
BDE-206	1.48 \pm 1.28	0.08 \pm 0.01	---	0.89 \pm 0.60	---	6.39 \pm 1.59
BDE-207	0.71 \pm 0.58	0.17 \pm 0.01	---	2.06 \pm 1.04	---	4.59 \pm 0.96
BDE-209	1.63 \pm 1.35	0.06 \pm 0.01	---	1.45 \pm 0.83	---	2.43 \pm 0.28
DBDPE	---	---	10.46 \pm 3.43	---	1.81 \pm 0.09	---
anti-DP	0.27 \pm 0.11	0.96 \pm 0.51	0.30 \pm 0.13	2.28 \pm 2.51	0.78 \pm 0.12	0.87 \pm 0.28
syn-DP	0.14 \pm 0.12	---	0.29 \pm 0.12	0.88 \pm 0.73	0.72 \pm 0.26	---

LCF (root to leaf concentration factor): ratio between leaf and root concentrations in dry weight basis.

ECF (leaf to fruit or edible part concentration factor): ratio between fruit and leaf concentrations in dry basis.

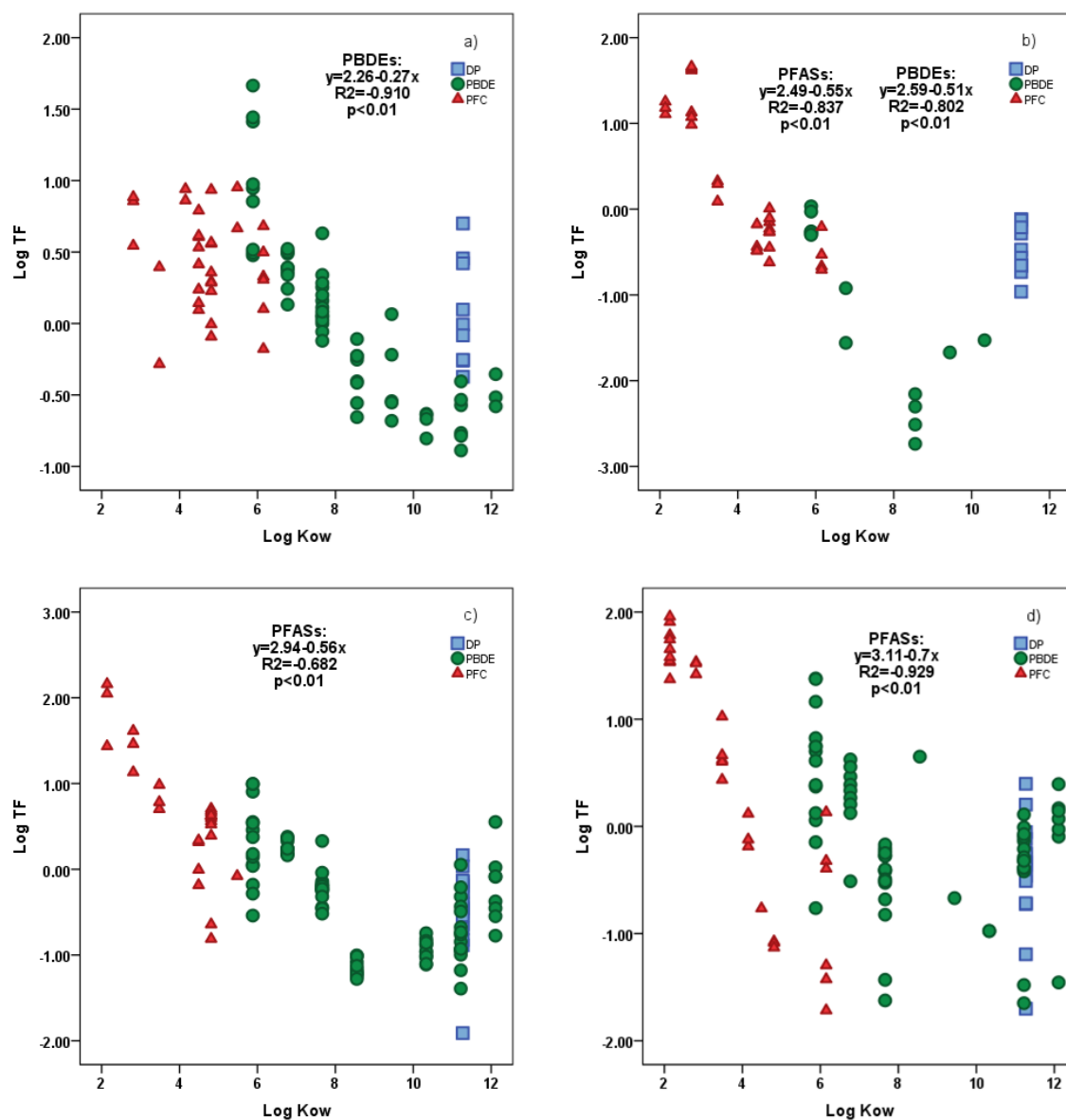


Fig. S4.- Relationship between transfer factor (log TF) in roots (a), stem (b), leaf (c) and fruit (d) for the analytes considered (triangles represent PFCs, circles PBDEs and squares DP) and log K_{ow}. Log K_{ow} used were calculated by EPISuite 4.1 (see Table S6).

Table S11. Concentrations of PFASs and HFRs in corn plant (ng/g w.w.) and earthworm (ng/g w.w or ng/g l.w.).

	Root	Leaf	Earthworm [*]
Treatment-1 (PFOS)			
PFBS	3.59 ± 1.80	27.6 ± 46.5	19.9
PFHxS	50.3 ± 12.6	599 ± 80.1	551
PFOS	5767 ± 2154	1735 ± 479	128887
Treatment-2 (Deca-BDE)			
BDE-206	0.78 ± 0.15	0.13 ± 0.02	14.7
BDE-207	0.78 ± 0.17	0.14 ± 0.02	22.3
BDE-209	25.3 ± 3.65	3.46 ± 0.64	222
Treatment-3 (PFOS+Deca-BDE)			
PFBS	N.D.	76.8 ± 30.8	13.3
PFHxS	24.7 ± 8.83	752 ± 421	531
PFOS	2530 ± 1060	1997 ± 593	15373
BDE 206	0.62 ± 0.20	0.05 ± 0.03	17.7
BDE 207	0.63 ± 0.19	0.11 ± 0.08	21.6
BDE 209	9.08 ± 3.65	1.08 ± 0.97	288

N.D. = not detected.

Treatment-1 :~50 mg PFOS/kg soil, Treatment-2: ~5 mg Deca-BDE/kg soil and Treatment 3: ~50 + ~5 mg/kg PFOS and Deca-BDE.

^{*} PFAS concentration based in wet weight (ng/g w.w.) and PBDE concentration based in lipid weight (ng/g l.w.).

References

- Alcock, R.E., Sweetman, A., Jones, K.C., 1999. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants I: selected compounds and physicochemical properties. *Chemosphere* 38, 2247-2262.
- Arp, H.P.H., Niederer, C., Goss, K.U., 2006. Predicting the partitioning behavior of various highly fluorinated compounds. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7298-7304.
- Braekevelt, E., Tittlemier, S.A., Tomy, G.T., 2003. Direct measurement of octanol–water partition coefficients of some environmentally relevant brominated diphenyl ether congeners. *Chemosphere* 51, 563–567.
- De Voogt, P., Zurano, L., Serné, P., Haftka, J.J.H., 2012. Experimental hydrophobicity parameters of perfluorinated alkylated substances from reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Environ. Chem.* 9, 564-570.
- Kelly, B.C., Ikonomou, M.G., Blair, J.D., Surridge, B., Hoover, D., Grace, R., Gobas, F., 2009. Perfluoroalkyl Contaminants in an arctic marine food web: Trophic magnification and wildlife exposure. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4037-4043.
- Wang, Z., MacLeod, M., Cousins, I. T., Sheringer, M., Hungerbuhler, K., 2011. Using COSMOtherm to predict physicochemical properties of poly-and perfluorinated alkyl substances (PFAS). *Environ. Chem.* 8, 389-398.
- Wania, F., Dugani, C.B., 2003. Assessing the long-range transport potential of polybrominated diphenyl ethers: a comparison of four multimedia models. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1252-1261.

ANEXO VI

Parámetros utilizados en la evaluación del riesgo asociado a la aplicación agrícola de biosólidos en relación a PFOS y PFOA.

Tabla 1. Anexo VI.

Propiedad físico-química			PFOS	PFOA
Log K_{ow}	Coeficiente de distribución o partición octanol-agua		4,49 ^a	4,81 ^a
Log K_{oc}	Coeficiente de distribución carbono orgánico-agua	L/kg	3,41 ^a	2,82 ^a
HENRY	Constante de la Ley de Henry	Pa m ³ / mol	3,190E-04 ^c	2,533 ^d
Biodegradación	Tendencia a la biodegradación		NO ^a	NO ^a
DT50 _{bio_suelo}	Vida media para la biodegradación en suelos	d	300 ^b	300 ^b

^aValores obtenidos mediante EPISuite 4.1.

^bValores obtenidos siguiendo las recomendaciones de la ECHA (ECHA, 2016a).

^cBrooke y col., 2004.

^dStemmler y Lammel, 2010.

Tabla 2. Anexo VI.

Parámetros generales para la evaluación de la exposición ambiental			
DEPTH _{suelo}	Profundidad máxima mezcla lodo-suelo	m	0,20 ^a
RHO _{agua}	Densidad de la fase acuosa	kg/m ³	1000 ^b
RHO _{aire}	Densidad del aire	kg/m ³	1,3 ^b
RHO _{sólido}	Densidad de la fase sólida	kg/m ³	2500 ^b
RHO _{suelo}	Densidad aparente del suelo húmedo	kg/m ³	1700 ^c
RHO _{lombriz}	Densidad aparente de la lombriz	kg/L	1 ^d
Fagua _{suelo}	Fracción de agua en el suelo	m ³ /m ³	0,2 ^b
Faire _{suelo}	Fracción de aire en el suelo	m ³ /m ³	0,2 ^b
Fsólido _{suelo}	Fracción de sólido en el suelo	m ³ /m ³	0,6 ^b
Foc _{suelo}	Fracción en peso del carbono orgánico en el suelo	kg/kg	0,01 ^e
F _{intestino}	Fracción de la carga intestinal de la lombriz	kg/kg	0,1 ^f
kasl _{aire}	Coefficiente de transferencia parcial de masa en la parte aérea de la interfase aire-suelo	m/d	120 ^d
kasl _{suelo}	Coefficiente de transferencia parcial de masa en la parte del suelo de la interfase aire-suelo	m/d	0,48 ^d
Finf _{suelo}	Fracción del agua de lluvia que se infiltra en el suelo		0,25 ^d
CONV _{suelo}	Factor de conversión de la concentración del suelo en peso húmedo y seco	kg/kg	1,13 ^c
RAIN	Tasa de precipitación	m/d	0,00177 ^g
R	Constante de los gases	Pa m ³ / mol k	8,314 ^d
TEMP	Temperatura de la interfase aire-agua	K	285 ^d
T	Tiempo	d	365

^aLa profundidad del suelo representa el intervalo de profundidad del suelo que es de interés. Se utiliza un valor de 0,20 m porque en esta área los cultivos presentan una mayor proporción de raíces (ECHA, 2016a).

^bValores obtenidos de la caracterización de los compartimentos medioambientales (Tabla R.16-8; ECHA, 2016a).

^cValor obtenido siguiendo las recomendaciones de la ECHA (ECHA, 2016a).

^dConstantes definidas por defecto (ECHA, 2016a).

^eSegún la Tabla R.16-8 corresponde un valor de Foc_{suelo} de 0,02 (ECHA, 2016a), sin embargo debido a la pobreza de materia orgánica de los suelos españoles se decide aplicar un valor de 0,01.

^fLa carga intestinal de las lombrices depende de las condiciones del suelo y la disponibilidad de alimento. Se han descrito valores en el intervalo de 2 y 20 %, por lo que se considera un valor medio de 10 % para este estudio (ECHA, 2016a).

^gValor obtenido a partir de la media de precipitación anual en España (1971-2000) de 649 mm/año.

Tabla 3. Anexo VI.

Parámetros específicos para la evaluación de la exposición ambiental			PFOS	PFOA
$K_{\text{aire-agua}}$	Coeficiente de partición aire-agua	m^3/m^3	1,34E-07	1,07E-03
$K_{\text{suelo-agua}}$	Coeficiente de partición suelo- agua	m^3/m^3	38,7	10,0
$K_{\text{p}_{\text{suelo}}}$	Coeficiente de partición sólido- agua en el suelo	L/kg	25,7	6,55
$k_{\text{volatilización}}$	Tasa de volatilización	1/d	2,09E-06	6,23E-02
$k_{\text{lixiviación}}$	Tasa de lixiviación	1/d	5,72E-05	2,21E-04
$k_{\text{bio}_{\text{suelo}}}$	Tasa de biodegradación en el suelo	1/d	2,31E-03	2,31E-03
k	Tasa de disipación del contaminante en el medio	1/d	2,37E-03	6,49E-02
Facc	Fracción de sustancia que permanece en el suelo al final de un año		4,21E-03	5,21E-11

Valores obtenidos siguiendo las recomendaciones de la ECHA (ECHA, 2016a).

ANEXO VII

Otros trabajos publicados relacionados con la investigación

1. *Transfer of emerging pollutants from Spanish biosolids used as agricultural soil amendments. Results of CECAREA project*.
de la Torre A., Navarro I., Sanz P., Porcel M.A., Pro J., Carbonell G., Martínez M.A.
Publicado en: SETAC Europe 25th Annual Meeting, Barcelona (2015) p. 376.
2. *Estudio de la presencia de compuestos perfluorados en distintas matrices medioambientales mediante Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) acoplada a Espectrometría de masas (MS/MS)*.
Navarro I.
Publicado en: Ciclo de Seminarios de Jóvenes Investigadores de CIEMAT, 2014.
ISBN: 978-84-7834-734-6.
3. *Transfer of emerging pollutants from biosolid amended soils to terrestrial ecosystems*.
de la Torre A., Navarro I., Sanz P., Porcel M.A., Carbonell G., Martínez M.A.
Publicado en: 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Spain, 31th August- 5th September, Madrid.
Organohalogen Comp. (2014) 76:562-565.
4. *Occurrence and fate of BDE 209, DP and PFOS in leachate and runoff waters coming from biosolid amended soils*.
Navarro I., de la Torre A., Sanz P., Porcel M.A., Carbonell G., Martínez M.A.
Publicado en: 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Spain, 31th August- 5th September, Madrid.
Organohalogen Comp. (2014) 76:558-561.
5. *CECAREA project: mobility and fate of pollutants from organic waste used as agricultural soil amendments*.
de la Torre A., Navarro I., Sanz P., Porcel M.A., Carbonell G., Martínez M.A.
Publicado en: 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Spain, 31th August- 5th September, Madrid.
Organohalogen Comp. (2014) 76:570-573.
6. *Emerging contaminants: Environmental risk assessment for soil organisms after biosolids application in agricultural land*.
Carbonell G., Beltrán E.M., Porcel M.A., de la Torre A., Navarro I., Martínez M.A., Fernandez C.
Publicado en: 24th SETAC Europe Annual Meeting, 11-15 Mayo 2014, Basilea (Suiza).
Ref: WE163.
7. *Carryover of perfluorinated compounds from waste-amended soils to plants*.
Navarro I., de la Torre A., Sanz P., Porcel M.A., Carbonell G., Martínez M.A.
Publicado en: IV Reunión Nacional de Dioxinas, Furanos y compuestos orgánicos persistentes relacionados, Alicante (2013). P1.
8. *Transferencia de contaminantes orgánicos emergentes mediante la valorización agrícola de residuos: lodos de EDAR y compost de RSU*.
Navarro I., de la Torre A., Sanz P., Porcel M.A., Carbonell G., Martínez M.A.

- Publicado en: IV Reunión Nacional de Dioxinas, Furanos y compuestos orgánicos persistentes relacionados, Alicante (2013). P2.
9. *Application of MS 3 systems for evaluating the transfer of emerging pollutants from amended agricultural soils to earthworms.*
de la Torre A., Navarro I., Sanz P., Pro J., Fernández C., Carbonell G., Martínez M.A.
Publicado en: IV Reunión Nacional de Dioxinas, Furanos y compuestos orgánicos persistentes relacionados, Alicante (2013). P10.
10. *Transfer of emerging pollutants from amended agricultural soils: leachate and runoff.*
de la Torre A., Navarro I., Beltrán E.M., Sanz P., Porcel M.M., Carbonell G., Martínez M.A.
Publicado en: 23rd SETAC Europe Annual Meeting, 12-16 May 2013, Glasgow, UK. TH084.
11. *Transfer of emerging pollutants from amended agricultural soils to earthworms.*
de la Torre A., Navarro I., Sanz P., Fernández C., Carbonell G., Martínez M.A.
Publicado en: Proceedings of the 32th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Cairns, 26-31 August, Queensland, Australia. Organohalogen Comp. (2012) 74: 481-484.
12. *Effects assessment of biosolids soil amendments on terrestrial organisms.*
Carbonell G., Martínez M.A., Torrijos M., Beltrán E.M., de la Torre A., Navarro I., García M.P., Del Río C., Pareja J.L., Pro J., Porcel M.A., Fernández C.
Publicado en: SETAC 6th World Congress, 20-24 May 2012, Berlin, Germany. Ref.:MO279.
13. *Analytical and ecotoxicological characterisation of the biosolid samples collected from Spanish Wastewater and Municipal Solid Waste Treatment Plants.*
Fernández C., Martínez M.A., Beltrán E.M., Torrijos M., Navarro I., de la Torre A., García P., Carbonell G..
Publicado en: SETAC 6th World Congress, 20-24 May 2012, Berlin, Germany. Ref.:MO80.
14. *Problemática ambiental de las sustancias químicas perfluoradas.*
Navarro I., Sanz P., Martínez M.A.
Publicado en: Tecnoambiente (2011) 214:17-22.
15. *Assessment of the presence of perfluorinated compounds in sewage sludge from Spain.*
Navarro I., Sanz P., Martínez M.A.
Publicado en: Proceedings of the 31th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Belgium, 21-25th August, Brussels. Organohalogen Comp. (2011) 73:208-211.
16. *Determinación de compuestos perfluorados en agua de río.*
Navarro I., Sanz P., Martínez M.A.

Publicado en: III Reunión Nacional de Dioxinas, Furanos y compuestos orgánicos persistentes relacionados, Santander (2011), p. 101.

17. *¿La aplicación de residuos como enmienda orgánica en suelos agrícolas es una práctica segura?*

Martínez M.A., Fernández C., Sanz P., de la Torre A., Navarro I., Alonso E., Pablos M.V., Pro F.J., González-Doncel M., Porcel M.A., Beltrán E., Martín F., Herráez I., Miranda F., Carbonell G.

Publicado en: III Reunión Nacional de Dioxinas, Furanos y compuestos orgánicos persistentes relacionados, Santander (2011), p. 97.

18. *Occurrence of perfluorinated compounds in Spanish sewage sludge.*

Navarro I., Sanz P., Martínez M.A.

Publicado en: 28th International Symposium on Chromatography, Valencia (2010) p. 620.

19. *Biomagnification assessment of concentrations. case study using perfluorooctane sulfonate (PFOS).*

Alonso E., Navarro I., Concejero M.A., Martínez M.A., Tarazona J.V.

Publicado en: Proceedings of the 29th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Beijing, China.
Organohalogen Comp. (2009) 71: 2072-2077.

20. *Optimization of a new method for determination of perfluorinated compounds in water.*

Navarro I., Sanz P., Martínez M.A.

Publicado en: IX Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines, San Sebastián (2009) p. 68.

21. *Caracterización de los lodos de depuradoras generados en España.*

Martínez M.A., Sanz P., Concejero M.A., de la Torre A., Navarro I. y otros (MARM, C.E.H.-CEDEX, IMIDRA, IGME y UCM).

Publicado en: Ed. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
ISBN: 978-84-491-0991-1 (2009).

22. *Development of a HPLC-MS/MS method for analysing emergent pollutants: perfluorinated compounds.*

Navarro I., Sanz P., Martínez M.A.

Publicado en: 12^{as}. Jornadas de Análisis Instrumental, Fira de Barcelona, Expoquimia (2008) p. 348.

